

## 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、齋藤幸一	岩手県環境保健研究センター（コア地衛研）
長島真美、新開敬行、原田幸子、林	志直、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）
戸田昌一、調 恒明*	山口県環境保健センター（コア地衛研～25年度）
山下育孝、四宮博人**	愛媛県立衛生環境研究所（コア地衛研26年度～）
芦塚由紀、吉富秀亮、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、宇宿秀三、森田昌弘	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）
岡山文香、三好龍也、内野清子、田中智之	堺市衛生研究所（サポート地衛研）
喜屋武向子、久場由真仁、仁平稔	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（～26年度）

\*\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長（27年度～）

### 研究要旨

インフルエンザウイルスサーベイランスにおいては、「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、検査体制の維持強化が図られている。平成 25-27 年度の間に本体制を活用して急きょ配布された H7 遺伝子検出試薬の感度の検証やウイルス検査の「質」確保に必要な書式等の検討を行うとともに、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。また血球凝集活性の低い分離株の型別対応、影山分担研究者によるウイルス遺伝子検出試験の外部精度管理、高下博士による抗ウイルス剤感受性監視のうち H275Y オセルタミビル耐性変異サーベイランスの維持強化に協力した。平成 25 年度はインフルエンザウイルス検査体制に関するアンケート調査解析結果を報告した。平成 26-27 年度は平成 28 年 4

月に施行される感染症法改正に伴って、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。

## 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。当該年度の分担研究において、上記インフルエンザウイルス検査体制の維持強化を目的とする調査研究を実施した。さらに平成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。そこで、インフルエンザウイルス検査を実施している地衛研が検査の「質」を確保するために定められた省令や要領に基づいて準備すべき書式案等の一部を本研究において作成した。

## 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(中国四国支部においてコア地衛研の交替があったため12機関が関与)が研究協力者として参画した。

(1)検査精度維持向上:中国におけるH7N9鳥インフルエンザ発生を受けて全地研に検査試薬が配布されたH25年度には、配布直後にH7遺伝子及びM遺伝子検査感度チェッ

クを行い、速やかに地全協会員にフィードバックした。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」を図る目的で内部精度管理等に必要な書類のリストを検討し、一部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インフルエンザの流行がみられたH25及びH27年度にはH275Yマーカーサーベイランス強化への協力依頼の周知を図るとともに、抗ウイルス剤感受性サーベイランス体制強化に寄与した。

(倫理面への配慮)本研究で用いる臨床検体及び患者情報は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施する。症例の分析においては、個々の症例が特定できないよう配慮して行う。

## C . 研究結果

各年度研究報告書に記載したとおり、25年度はインフルエンザウイルス検査体制に関するアンケート調査解析結果を報告した。平成26-27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。

## 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、とりわけ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。

25-27 年度は検査法修正等の都度現場として検証し、毎年度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) 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 2012/13 シーズン

北海道立衛生研究所報 63, 2013

2) 川上千春、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(2012 年 9 月~2013 年 5 月) 横浜市衛生研究所報 52 69-75, 2013

3) 吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之 2012/13 シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの抗原性及び系統解析 福岡県保健環境研究所報 40 90-93, 2013

4) 安井善宏、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で 2013/14 シーズンに初めて分離された B 型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) の性状 病原微生物検出情報 34(12) 376-377, 2013

5) 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、今井正樹、伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、小田切孝人、田代真人、全国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 国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤体制株の検出状況(途中経過) 病原微生物検出情報 34 (5)141-142, 2013

6) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、土井輝子、伊東玲子、佐藤彩、菅原裕美、江島美穂、金南希、三浦舞、今井正樹、小

- 田切孝人、田代真人、小口晃央、大下龍蔵、藤田信之、全国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  
2012/13 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 34(11)328-334, 2013
- 7) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T. Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 27(8):368-374, 2014.
- 8) Hiroi S, Morikawa S, Nakata N, Maeda A, Kanno T, Irie S, Ohfuji S, Hirota Y, Kase T Trivalent influenza vaccine-induced antibody response to circulating influenza A (H3N2) viruses in 2010/11 and 2011/12 seasons. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(2)386-390, 2015
- 9) Morikawa S, Hiroi S, Kase T Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *Journal of Clinical Virology* 64 59-63, 2015
- 10) 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 2013/14 シーズン 北海道立衛生研究所報 64 2014
- 11) 高橋雅輝、岩渕香織、梶田弘子、佐藤直人、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25年度) - インフルエンザ 2012/2013 シーズン及び 2013/2014 シーズン - 平成 25 年度版岩手県環境保健研究センター年報 第13号 71-79 2015
- 12) 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 (2013年9月~2014年5月) 横浜市衛生研究所報 53:59-67, 2015
- 13) 吉富秀亮、吉山千春、濱崎光宏、石橋哲也、堀川和美. 福岡県における 2013/14 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 88-91 第41号 2015
- 14) 久場由真仁、喜屋武向子、高良武俊、新垣絵理、加藤峰史、岡野祥、久高潤、新垣あや子、大野惇. 2013/14 シーズンにおけるインフルエンザウイルスの流行 沖縄県 病原微生物検出情報 35(11) 262-263, 2014
- 15) 安井善宏、中村範子、安達啓一、尾内彩乃、廣瀬絵美、伊藤雅、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県におけるインフルエンザウイルス流行状況と分子疫学的解析 - 2009/10 ~ 2013/14 シーズン - 愛知県衛生研究所報 65 9-16, 2015
- 16) 中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、岸田典子、徐紅、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、江島美穂、三浦舞、今井正樹、田代真人、渡邊真治、小田切孝人、全国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 2013/14 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 35 254-258, 2014
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 調 恒明 インフルエンザ病原体サーベイランスの変化とその意味 Pharma Medica 33(11) 15-18 2015
2. 学会発表
- 1) Kawakami C, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Morita M, Tobita Y, Funayama K, Mizuno T, Mitamura K, Yamazaki M, Ichikawa M Usefulness of nose-blowing specimens for cluster influenza surveillance in Yokohama city, Japan Options for the Control of Influenza VIII Cape Town South Africa 2013 年 9 月
- 2) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘 集団かぜ調査における鼻かみ検体の有用性 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013 年 10 月
- 3) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、石田勢津子、岡野素彦 オセルタミビル耐性 H3N2 インフルエンザウイルスの迅速検出系の構築 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013 年 11 月
- 4) 藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、高下恵美、今井正樹、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2012/13 シーズンのインフルエンザ流行株と 2013/14 シーズンのワクチン株 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013 年 11 月
- 5) Kawakami C, Takeuchi M, Mitamura K, Takashita E, Odagiri T Analysis of influenza virus responsible for persistent infection after drug administration in an immunosuppressed patient

- Third isirv-Antiviral Group Conference  
Tokyo 2014年6月
- 6) 高橋雅輝  
呼吸器ウイルスを対象とした病原体サーベイランスについて - インフルエンザウイルスとその他の呼吸器ウイルス -  
もりおかこども病院カンファランス 盛岡市 2014年5月27日
- 7) 高橋雅輝  
小児呼吸器ウイルス感染症の疫学的特徴について  
第30回岩手 Farm to Table フォーラム研究会 盛岡市 2014年5月28日  
( <http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~farms/kenkyukai.html> )
- 8) 高橋雅輝、佐藤直人、岩淵香織、五日市恵里、齋藤幸一  
岩手県における呼吸器ウイルス検出状況について - インフルエンザウイルス及びその他の呼吸器ウイルス -  
平成 26 年度岩手県保健福祉環境行政セミナー 盛岡市 2015年2月13日
- 9) 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 2013/14 シーズンのインフルエンザ流行像  
第 28 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 鳥取 2014年7月
- 10) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下恵美  
入院・重症例における AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析  
第 46 回日本小児感染症学会 東京 2014年10月
- 11) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、小田切孝人 3 シーズンにわたって混合流行した B 型インフルエンザウイルスの遺伝子解析  
第 62 回日本ウイルス学会 横浜 2014年11月
- 12) 森川佐依子、加瀬哲男：小児うがい液からの継続したウイルス検出の試み 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 2014年10月 岡山
- 13) 吉富 秀亮、吉山 千春、濱崎 光宏、石橋 哲也 2013/14 シーズンにおけるインフルエンザウイルスの検出状況  
第 61 回福岡県公衆衛生学会 福岡 2014年5月
- 14) 安井善宏、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で 2013/14 シーズンに分離した AH3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子多様性と分子疫学的解析  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014年11月
- 15) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2013/14 シーズンにおける NA 阻害剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014年11月
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

25) 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

26) 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

### 3 . その他

(シンポジウム、講演等)

1) 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  
AH3 型ウイルスの増殖性と NA アミノ酸変異  
第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シ  
ンポジウム 札幌 2013 年 6 月

2) 皆川洋子、安井善宏、山下照夫、平成  
24 年度小田切班コア・サポート地衛研  
地衛研のインフルエンザ検査・サーベイラ  
ンス体制の現状と展望 . シンポジウム III  
インフルエンザウイルス 衛生微生物技術  
協議会第 34 回研究会 名古屋市  
2013 年 7 月 12 日

3) 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、飛田ゆう子、  
船山和志、水野哲宏

集団かぜ調査における鼻かみ検体導入の試  
み . シンポジウム III インフルエンザウ  
イルス 衛生微生物技術協議会第 34 回研

研究会 名古屋市 2013年7月12日

(検査マニュアル)

4) 中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下  
恵美、中内美名、高山郁代、影山 努、小  
田切孝人、長野秀樹、高橋雅輝、林 志直、  
川上千春、滝澤剛則、加瀬哲男、岡山文香、  
山下育孝、千々和勝己、喜屋武向子、安井  
善宏、皆川洋子

インフルエンザ診断マニュアル(第3  
版)2014年9月

#### **G . 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

## 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 1～3 回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

高橋 仁 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こととなる。本研究では平成 25、26、27 年度に各一回、全国の地方衛生研究所を対象にしたリアルタイム 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)評価を実施したので、その解析結果を報告する。

### A . 研究目的

平成 24 年 5 月 11 日に「新型インフルエンザ等対策特別措置法」が公布され、新型インフルエンザの発生時は、感染拡大防止策の実施のため、全国の地方衛生研究所において新型インフルエンザに対する PCR 検査の実施が求められる事になり、全国で適切に新型インフルエンザの確定検査が実施できるよう、地方衛生研究所においては、その検査体制の整備が急務となった。また、平成 26 年 11 月には改正感染症法が成立し、平成 28 年 4 月から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あり、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、その診断検査態勢づくりの一環として、平成25年度に74カ所、平成26年度に72カ所、平成27年度に73カ所の地方衛生研究所を対象にしたリアルタイム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の検査精度向上を目的とする外部精度管理(EQA)評価を実施した。

## B. 研究方法

平成25年度は全国74カ所の地方衛生研究所に対して、実施要項(添付資料1)、検査方法等に関するアンケート、結果記入ファイルの配布を行い、配布済みのH5およびH7亜型検出用陽性コントロールを利用したH5およびH7亜型定量的検査を実施するように依頼し、検査結果を集計して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整備の確認と各診断検査の検査精度向上のためのEQA評価を行った。

平成26年度は全国74カ所の地方衛生研究所に対して、2014年7月1日に「EQA2014実施要項」(添付資料2)および参加確認を兼ねたアンケートを配布し、EQAへの参加を表明した72カ所の地方衛生研究所に対して、2014年7月28日～30日にパネル検体(RNA抽出が不要な6検体で常温輸送でも劣化する事がない抽出核酸の乾燥品)を送付し、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、地方衛生研究所で行っている診断方法により、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するEQAを実施した。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」、「結果報告時アンケート」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、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整備の確認と各診断検査の検査精度向上のためのEQA評価を行った。

平成27年度は全国74カ所の地方衛生研

研究所に対して、2015年7月27日に「EQA2015実施要項」(添付資料3)および参加登録票を配布し、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検体で常温輸送でも劣化する事がない抽出核酸の乾燥品)を送付して、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

平成25年度は全国74カ所の地方衛生研究所で行った試験結果および感染研で行った試験結果を集計し、各地方衛生研究所の検査結果について詳細な解析を行い、「結果の解釈について(添付書類4)」、「アンケートおよび結果記入ファイルからの集計(添付書類5)」および各地方衛生研究所向けの「解析結果」をそれぞれ送付した。また、問題が推定された場合は、トラブルシューティングのための参考として、解析結果にコメントを記入し、個別にフィードバック

を行った。

平成26年度は全国72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、「第2回全国地衛研外部精度管理EQA2014実施結果について」(添付資料6)、「定量的リアルタイムRT-PCRと精度管理について」(添付資料7)、「パネル検体の結果」シートの見方、「EQAの結果および結果報告時アンケートの集計」(添付資料8)を本EQA評価に参加した全国72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「結果ファイル(地衛研名)」を各地方衛生研究所の検査結果については詳細な解析を行い、各地方衛生研究所向けに「解析結果」作成して送付した。また、結果解析において検出系等に問題がある事が推定された場合には、トラブルシューティングへの参考として、結果ファイルにコメントを記入して、個別にフィードバックを行った。

平成27年度は全国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9)、「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10)、「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11)、「5.EQA2015の結果およびアンケートの集計」(添付資料12)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13)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。

平成 25 年度の EQA では、全国に配布した H5 および H7 検出用陽性コントロールを共通の標準品として、Type A 検出、H5 および H7 検出の定量的リアルタイム RT-PCR の検査結果を評価する事で、これらの検出系において精度の高い検査が行えているか、行えていないとすればどこに問題があるか、その原因を特定(特定できない場合は推定)することを目的に検査結果の解析を行った。この EQA ではこれらの陽性コントロールに問題がない事を前提にして評価を行うため、保管中の陽性コントロールに何らかの問題があった場合(指定濃度に調製されずに保管されている場合、ピペッターの不備など何らかの原因で指定濃度になっていなかった場合、凍結融解の繰り返しによる劣化あるいは冷凍庫の不調など保管状況が適正でなく劣化した場合など)あるいは EQA 実施時に陽性コントロールの希釈や試薬調製の量が正確でなかった場合(希釈時に均一

に混ざっていなかった場合やピペッター分取量が不正確だった場合など)は、正確な評価を行う事が難しい。一方で、明らかに保管していた陽性コントロールあるいはプライマー・プローブに問題があった場合は、感染研で保管された陽性コントロールを新たに配布する、新しいプライマー・プローブを配布するなどしてトラブルシューティングを行ってもらい、問題の解決に繋がったケースも多く、本 EQA はリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 および H7 検出検査の精度管理に有用であったと考えられた。

平成 26 年度の EQA では、ほぼ全ての地方衛生研究所が全てのパネル検体に対して、正確に亜型の同定が行えていた(添付資料 8 ページ 1 表を参照)。この EQA では配布パネルの 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である。この Ct 値の比較により、恐らく配布済みの 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が劣化したことにより、一部の地方衛生研究所では検出精度が悪くなっている事も判明した。ただし、今回の EQA 評価では、最も RNA 濃度の薄いパネル検体で 20 コピー/ $\mu\text{L}$  であり、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 10 倍濃い濃度となるが、この濃度であれば、ほぼ全ての施設で検出可能な濃度であった。なお、この濃度のパネル検体 B(H5N1)について、1 つの施設が不正解となっているが、H5 が検出できなかったのではなく、解釈の違いにより、他の亜型も検出したとの報告だったため、不正解となったが、H5 と H7 亜型の検出に関していうと、この濃度であれば全ての地方衛生研究所が検出可能というこ

とになり、昨年度の EQA 評価に比べると、全体的に検査精度が向上したのは明らかである。

平成 27 年度の 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(添付資料 12 ページ 1 表を参照)。この 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度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

平成 25 年度は、陽性コントロールに何らかの問題があり、精度管理がうまく行えないケース、ピペッターに問題がある場合あるいは手技が安定しないケース、陽性コントロールの希釈あるいは反応試薬の分取を正確にできなかったケース、凍結融解の繰り返しによりプライマー・プローブ等試薬に何らかの問題があったケース、リアルタイム PCR 機器のメンテナンス不備により機器の測定が正確ではなかったケース、など原因は様々であり、精度の高い検査が行えない可能性がある地方衛生研究所もいくつかあったが、本 EQA によりトラブルシューティングを行い、問題点を改善することにより、検査精度の向上を図った地方衛生研究所もあり、本 EQA の効果が確認された

平成 26 年度は、アンケート結果により、検査手順を改善した方が良い施設がいくつかあったものの、前年度に比較すると正しい手順で検査を行っている施設が明らかに増加していた。これは、前年度行った EQA 評価で、問題が推定できた場合はトラブルシューティングを行うようにアドバイスをしており、問題点が改善された結果であると考えられる。

平成 27 年度は、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。

平成27年度は、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11)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10)を作成している。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 1 回全国地衛研外部精度管理(EQA)実施要項

#### EQA の実施について：

平成 25 年 6 月 7 日に「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」が政府より示され、新型インフルエンザ等が発生した際は、地方衛生研究所を設置する地方公共団体で PCR 検査等を実施する事が定められました。有事の際にも正しい検査結果を得るためには、日頃から検査の精度を管理・維持する事が重要と考えられます。

平成 23、24 年度には、本 EQA に先駆けて 11 か所のコアおよびサポート地方衛生研究所を対象とし、「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 EQA を実施しました(厚生労働科学研究費補助金「地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究」主任研究者 小田切孝人)。この EQA で問題点が明らかになったケースでは、トラブルシューティングを行って問題点を改善する事により検査精度の向上を図る事ができました。

WHO でも各国・地域の National Influenza Center (NIC) に対して EQA を行っていますが(参考資料 ; <http://www.who.int/entity/wer/2013/wer8804.pdf>)、各 NIC により検出方法が異なっているため、型・亜型同定の同定精度および検出感度の把握を主眼とする EQA のみが実施されています(未知の検体 10 サンプルについて型・亜型の同定を行う)。しかしこの EQA では、型・亜型検出結果の正誤を確認するだけで、問題があった場合の詳しい原因究明までは行われないため、トラブルシューティングを行って検査精度の向上を図る事は難しいと考えられます。

一方、国立感染症研究所が示した H5 および H7 亜型検査診断マニュアルに記載のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件は、国立感染症研究所にて一定の検出感度・特異性については担保しています。全国に配布した共通の陽性コントロールに対して定量的検査を伴う EQA を実施する事により、診断系に問題があった際は、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、手技等のどこに問題があるのか、原因追究が比較的容易に行えると考えています。

本 EQA では、定量的検査を伴った H5 および H7 亜型検査診断検査を実施していただき、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整備の確認と各診断検査の検査精度の向上が目的となります。「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」内の「試薬調製手順記入欄」および「5\_アンケート(Excel ファイル)」は、EQA で問題が生じた際に、原因究明を行うための参考に利用します。回答については、一部保留していただいても差し支えありませんが、EQA の結果に問題が生じた際は、あらためて未記入カ所へのご回答をお願いする場合や、新たに質問させていただく場合があります。回答欄は大半が選択式となっておりますので、できるだけ全ての項目にご回答にいただきますようご協力をお願いいたします。また、それぞれのファイルへの「入力例」を作成しました。各ファイルへの入力の前に「入力例」をご一読くださいますようお願いいたします。

本 EQA は平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金「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)

EQA の実施要項 :

1. 実施スケジュール

- ・測定期間： 実施要項到着日～平成 25 年 10 月 31 日
- ・結果報告およびアンケートの締切：平成 25 年 10 月 31 日
- ・集計報告： 平成 25 年 12 月頃より順次

2. 配布書類：

- ・1\_実施要項(本紙) (Word ファイル)
- ・2\_鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版) (PDF ファイル)
- ・3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)：「入力例」は同ファイル内の別シートに記載
- ・4\_アンケート入力例(PDF ファイル)
- ・5\_アンケート(Excel ファイル)

3. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

- ① TypeA/H7 (マーカー入) 陽性コントロール RNA：(以降 H7PC と記します)  
平成 25 年 7 月に感染研より配布済み
- ② TypeA/H5 (マーカー入) 陽性コントロール RNA：(以降 H5PC と記します)  
平成 24 年 9 月、感染研より高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)同定技術研究会にて配布済み
- ③ 各所で使用している陰性対象 (滅菌蒸留水等)

4. 測定方法

1) 各所で保管してある H7PC および H5PC を、配布済みの各ウイルス検出マニュアル内の「陽性コントロールの管理・使用について」に従って、それぞれ  $10^{-1}$ ～ $10^{-4}$  希釈までの 10 倍段階希釈液を作製して下さい。

2) 作製した 10 倍段階希釈液および陰性対象(各所でお使いのもの)について、H7PC に対しては TypeA と H7、H5PC に対しては Type A と H5 のリアルタイム RT-PCR 法にて、各サンプルの Ct (Cp) の測定を行って下さい。

\*本実施要項と同時に、6 月 21 日に配布した「2\_鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版)」を再配布いたします。H5 ウイルス検出法については、感染研ホームページに掲載されている「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)」を参照下さい([http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian\\_influenza\\_2003.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf))。

5. 結果入力

1) 「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「結果記入欄\_入力例」シートおよび「試薬調製手順記入欄\_入力例」をご一読下さい。

2) 測定した Ct (Cp) 値は小数第 1 位まで算出し、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「結果記入欄」シートへ、Ct (Cp) 値および検査時のレイアウト (各希釈系列・陰性対象の位置とプライマー・プローブの型・亜型を入力)を、「結果記入欄\_入力例」シートを参考

(添付資料 1)

にして入力して下さい。

- 3) 検査を行った際の試薬調製手順(反応試薬の調製、陽性コントロールの希釈等)の詳細を、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「試薬調製手順記入欄」シートへ、「試薬調製手順記入欄\_入力例」を参考にして入力して下さい。
- 4) 入力後の「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」のファイル名を「結果入力 2013\_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、全ての機器を対象にする必要は必ずしもありませんが、複数台で同時に検査を行う場合でかつ希釈した陽性コントロールが同じ場合は、「結果記入欄」シートの特記事項にその旨を明記したうえで、「結果記入欄」シートおよび「試薬調製手順記入欄」シートをコピーして、それぞれの結果および試薬調製手順を入力して下さい。また、2回以上の検査を行いかつ希釈した陽性コントロールの作製日時が異なる場合は、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」をコピーして陽性コントロールの作製日時ごとに結果および試薬調製手順をそれぞれ別の「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」に記入して下さい。この場合、ファイル名を変更する際に、通し番号を付けて下さい。(例：「結果入力 2013\_国立感染症研究所 1」「結果入力 2013\_国立感染症研究所 2」)

6. アンケートへの回答

各地衛研で行っている検査方法や使用しているキット等、陽性コントロールの希釈に使用した試薬および器具について「5\_アンケート(Excel ファイル)」がありますので添付の「4\_アンケート入力例(PDF ファイル)」をご一読の後、入力例を参考にして「アンケート入力欄」シートへご回答下さい。

アンケート入力後の「5\_アンケート(Excel ファイル)」のファイル名は「アンケート 2013\_地衛研名」に変更して下さい。(例：「アンケート 2013\_国立感染症研究所」)。

7. 上記 5、6 で作成した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「EQA2013 結果\_地衛研名」をご記入下さい。

E-mail : eqa\_influenza@nih.go.jp

ご質問等は下記へ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

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 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施について

平成 25 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、配布済みの陽性コントロールを用いて、定量的な H5 および H7 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 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が EQA の評価対象となります。

また、本年度はパネル配布を伴うことから、参加確認を兼ねた事前アンケートを送付します。本 EQA に参加する場合は、事前アンケート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(事前アンケートの回答締切は平成 26 年 7 月 11 日です)。

本 EQA は平成 26 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 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 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施要項

#### 1. EQA2014 の目的と解析対象について

感染研より配布するパネルに対する 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今回の外部精度管理の評価対象となります。

#### 2. EQA2014 実施スケジュール

・事前アンケートの送付:平成 26 年 7 月 1 日

(本メール)

・事前アンケートの回答締切:平成 26 年 7 月 11 日

([eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp) へご返答下さい)

・パネル検体発送予定:平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日

(普通郵便にて発送します)

・パネル検体発送完了の連絡(受領書、結果記入ファイル、結果報告時アンケートの送付):発送完了時

(参加地衛研へ個別にメールします。パネル到着後に同封の受領書に必要事項をご記入の上、メール添付もしくは FAX にてご返送下さい)

・測定期間:パネル検体到着日～平成 26 年 9 月 12 日

・結果報告およびアンケート送付の締切:平成 26 年 9 月 12 日

([eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp) へご送付下さい)

・集計報告:平成 26 年 11 月頃より順次

(参加地衛研へ個別にメールします)

#### 3. EQA2014 への参加について

今回行う EQA2014 に参加される場合は、平成 26 年 7 月 1 日に送付する事前アンケート(入力時間は 10 分程度)に回答の上、ファイル名を「事前アンケート\_地衛研名」に変更して平成 26 年 7 月 11 日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)EQA2014 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は事前アンケートへの回答および送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2014 参加

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

#### 4. EQA2014 の内容

##### 4-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

感染研より配布した RNA 抽出が不要な 6 検体(平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日に発送予定)

**\*核酸抽出済みの乾燥品を配布しますので、200 $\mu$ L の滅菌蒸留水に溶解して使用して下さい**

(添付資料 2)

い。

#### 4-2. 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、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、リアルタイムRT-PCR法による結果(Ct, Cp値)をもとに検出感度・特異性についての解析を基に行います。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A型インフルエンザウイルスの亜型診断検査とB型インフルエンザウイルスの診断検査の結果についての詳細解析は行えませんが、正しい診断結果が得られているかどうかの確認は行います。参考結果とはなりますがリアルタイムRT-PCR法以外の方法で診断検査を行った場合も、結果をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2014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。

#### 4-3. 測定方法

- 1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドウンを行ってから200 $\mu$ 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亜型診断検査を行って下さい。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。
  - ・少なくとも1回の検査で、6検体を同時に検査する事
  - ・亜型同定検査を行う際には、必ず同時にType Aの検査を行い、かつそれらを必ず一枚のプレート上で検査する事
- 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。

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、参考までにその結果もご送付下さい。
- 5) 陽性および陰性コントロールを含め、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「結果記入欄」シートに、検査時のレイアウト(陽性対象・陰性対象の位置とプライマー・プローブの型・亜型を入力)とともに、入力して下さい(入力法は「結果記入欄\_入力例」シートを参考にして下さい)。
- 6) 検査を行った際の試薬調製手順(反応試薬の調製、陽性コントロールの希釈等)の詳細を検査毎に、結果記入ファイル(Excelファイル)の「試薬調製手順記入欄」シートに入力して下さい(入力法は「試薬調製手順記入欄\_記入例」シートを参考にして下さい)。
- 7) 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(ファイルが複数ある場合は通し番号を振って下さい。(例:「結果入力\_国立感染症研究所1」「結果入力\_国立感染症研究所2」))

(添付資料 2)

(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、「結果記入欄」シートの特記事項にその旨を明記したうえで、結果記入ファイルもしくは「結果記入欄」シートをコピーして、結果入力を行って下さい。また「試薬調製手順記入欄」シートについても同様にコピーして、検査毎に手順を入力して下さい。

5. 結果報告時アンケートについて(入力時間は 15 分程度です)

各地衛研で行っている試験方法や使用キット等、陽性コントロール、試薬および器具、また今回の試験方法について、結果報告時アンケートファイル(Excel ファイル)がありますので、「アンケート\_入力例」シートを参考にして「アンケート記入欄」シートへご回答下さい。

アンケート記入後のファイル名は「結果報告時アンケート\_地衛研名」に変更して下さい。(例:「結果報告時アンケート\_国立感染症研究所」)。

6. EQA2014 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)EQA2014 結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2014 結果

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

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3)

## 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3)

## 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 500 $\mu$ L 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 500 $\mu$ L 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3)

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ドウンを行ってから 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3)

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)

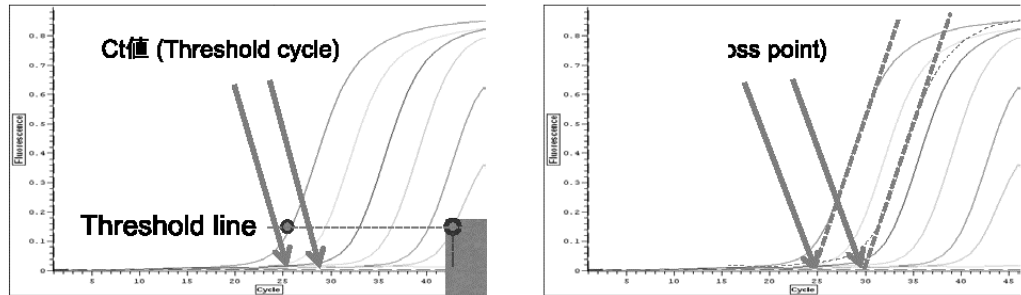
(042-848-7166 直通)

担当:影山/高山/中内

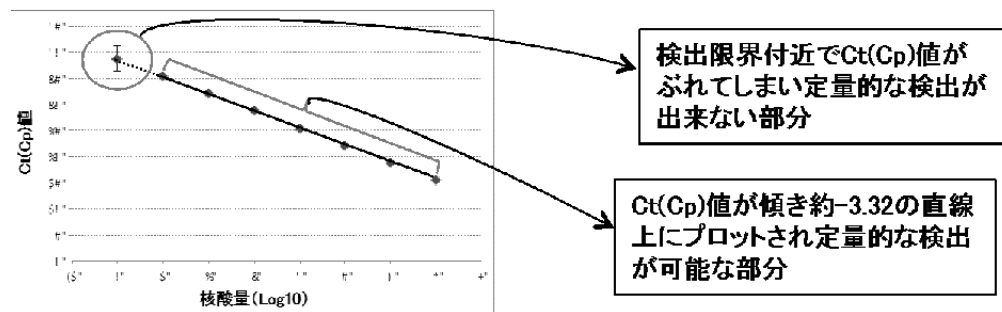
## 結果の解釈について

### 1. 定量的リアルタイム RT-PCR について

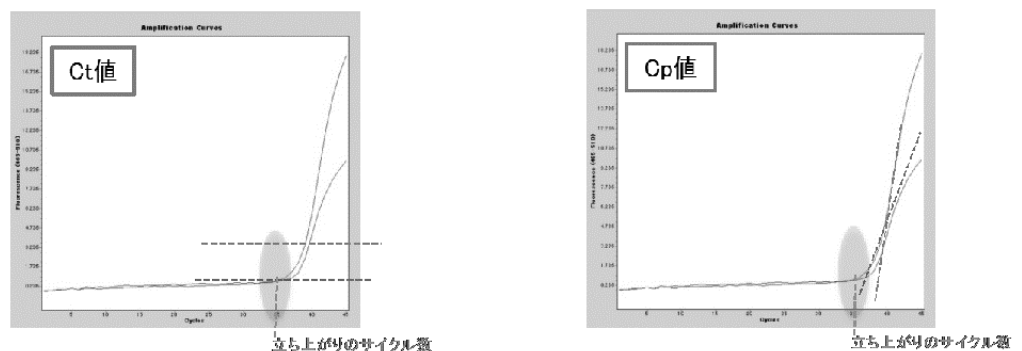
#### 1-1. 原理



Ct 値は Threshold line とシグナルとの交点の Cycle 数（上左図）、Cp 値は指数増幅期の回帰曲線と横軸（ベースライン）との交点の Cycle 数（上右図）を表します。本 EQA で行った TypeA, HA(H5, および H7)検出系は、試薬、プライマー、プローブに問題が無い場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10)と Ct(Cp)値の間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上傾き約-3.32 の直線上にプロットされます（下図）。



#### 1-2. 各検出系間の Ct 値(Cp 値)の乖離について



全ての検出系は、検出系の種類が異なっても、ターゲット核酸のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりのサイクル数がほぼ同じになるよう構築しています。上左図のように、Threshold line を青線のところに引くと2つの検出系間の Ct 値は乖離しませんが、赤線のところに引くと少し乖離が見られます。また、上右図のように、Cp 値でも乖離が見られます。これは、検出系の種類によって、シグモイドカーブの形がそれぞれ

(添付資料 4)

異なるためです。データの解析時に必ずシグナルの立ち上がりのサイクル数とシグモイドカーブをご確認下さい。

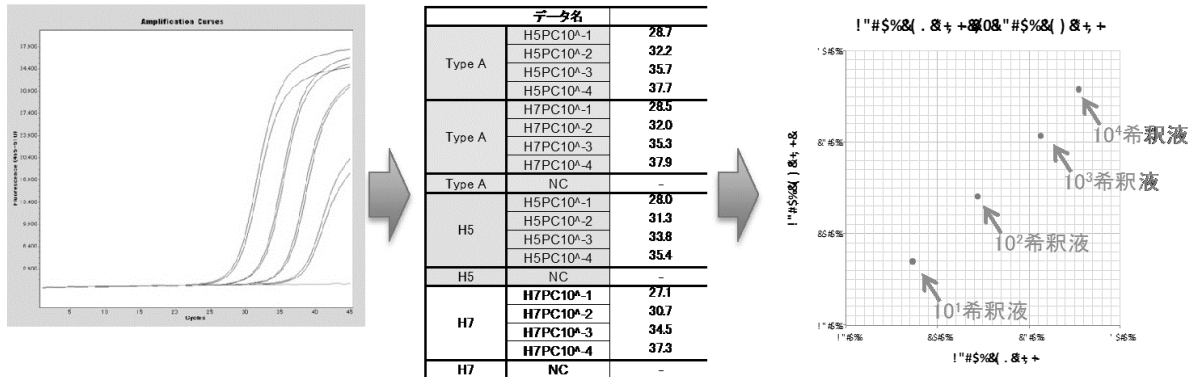
## 2. 結果の解析方法について

### 2-1. EQA で用いた陽性コントロールについて

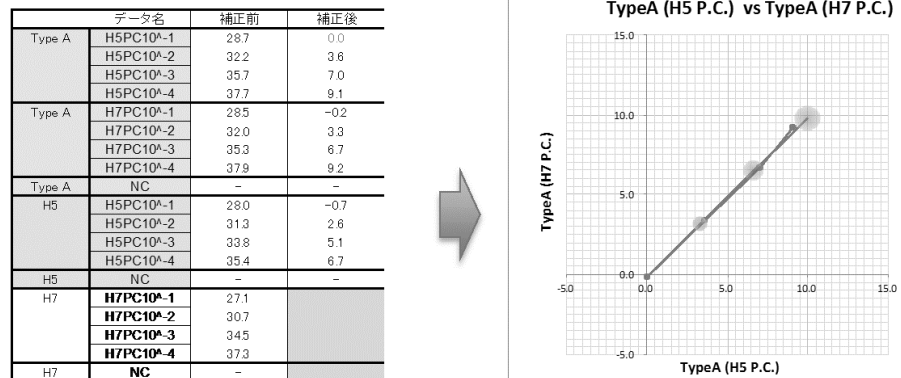
今回の EQA では、10 倍階段希釈した陽性コントロールをテンプレートとし、定量的リアルタイム RT-PCR 法を実施して、各検出系の Ct(Cp)値を比較することで精度の高い検査ができていますか解析を行いました。配布した各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子 (TypeA 検出系のターゲット遺伝子) と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じで、検出系に問題がない場合、各陽性コントロールの 10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup> 希釈液までは必ず定量的に検出できる濃度となっています。すなわち、陽性コントロールを 10 倍階段希釈していくと、10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup> 希釈液までは、PCR 増幅効率が 100%の場合は、理論上約 3.32 ずつ Ct(Cp)値が増加しますが、10<sup>4</sup> 希釈液は検出限界付近の核酸量のため、検出できない、あるいは検出できたとしても、検査ごとに Ct(Cp)値が変動する可能性があります。

### 2-2. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較

TypeA 検出系を評価するために、2 種類の陽性コントロール間の TypeA 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります (下図)。



今回の解析では、H5 陽性コントロールの 10<sup>1</sup> 希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました (下図)。



(添付資料 4)

TypeA 検出系に問題がなければ、H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、2 種類の陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 陽性コントロールの  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線 (グレーの直線) 上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット (グレーの円の中心点) されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。 $10^4$  希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合もあります。

### 2-3. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

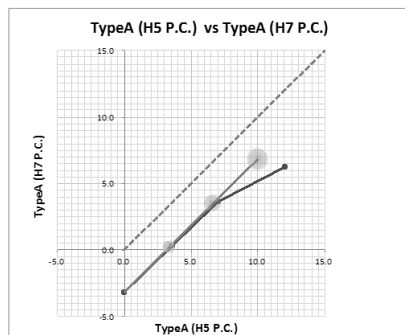


図 1  $10^1$  希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、TypeA (H5 P.C.) の Ct(Cp)値が TypeA (H7 P.C.) の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より下にプロットされています。これは、H7 陽性コントロールと比べ H5 陽性コントロールに問題があるためと考えられ、H5 陽性コントロールが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。

逆に、すべての希釈液で、TypeA (H7 P.C.) の Ct(Cp)値が TypeA (H5 P.C.) の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされた場合は、H7 陽性コントロールに問題があると考えられます。

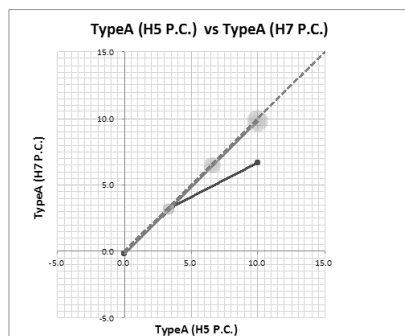


図 2  $10^2$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない (例で示した図は  $10^3$  希釈液のみずれた場合です)

左図の場合、 $10^2$  希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、 $10^3$  希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、両方の陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、TypeA 検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

(添付資料 4)

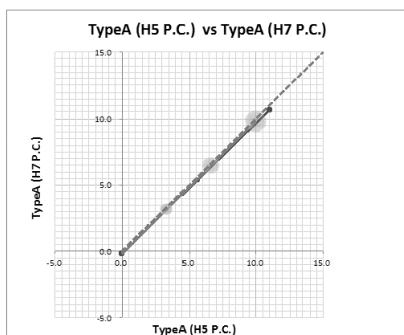
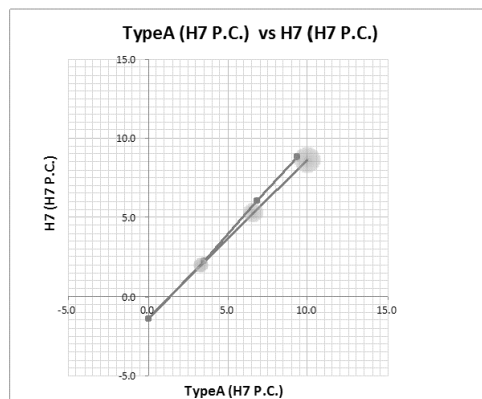
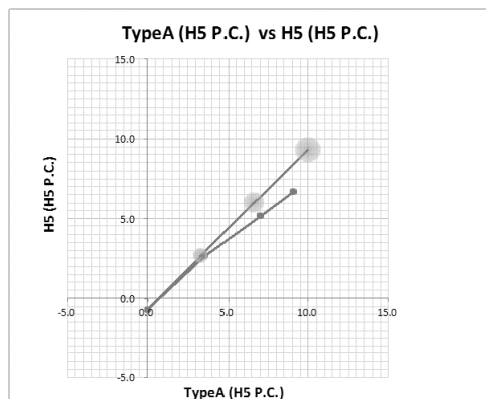


図3  $10^2$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている左図の場合、各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされています。これは、反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により TypeA 検出系において定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

#### 2-4. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較

TypeA と H5 検出系を評価するために、H5 陽性コントロールの TypeA 検出系と H5 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。今回の解析では、TypeA 検出系の  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図左）。H5 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります。

TypeA と H7 検出系の評価についても、上記と同様に H7 陽性コントロールの TypeA 検出系と H7 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較するため、TypeA 検出系の  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図右）。



TypeA および HA 検出系に問題がなければ、各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 もしくは H7 陽性コントロールの  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線（グレーの直線）上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット（グレーの円の中心点）されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。 $10^4$  希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合があります。

(添付資料 4)

## 2-5. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

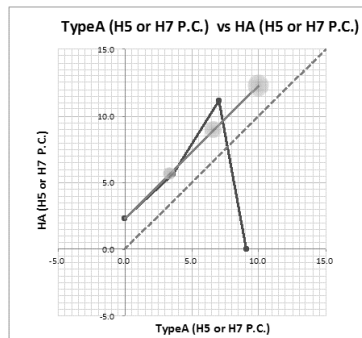


図 4  $10^1$  希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、HA 検出系の Ct(Cp)値が TypeA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされています。これは、HA 検出系に問題があるためと考えられ、HA 検出系において、プライマー、プローブが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、ストック作製時に濃度調整が正しくなかったなどの可能性があります。

逆に、TypeA 検出系の Ct(Cp)値が HA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きくなり、赤の破線より下にプロットされた場合は、TypeA 検出系に同様の原因あると考えられます。

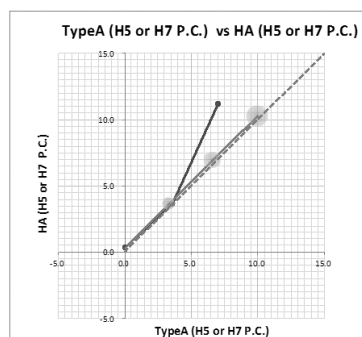


図 5  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない

左図の場合、 $10^2$  希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、 $10^3$  希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、一方の検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

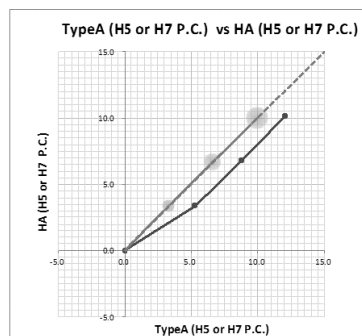


図 6  $10^1$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線と平行にプロットされない

左図の場合、TypeA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっています。反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により、TypeA 検出系において正確な測定ができなくなってしまった可能性があります。逆に、HA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっている場合は、HA 検出系において同様の理由から定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。



(添付資料 4)

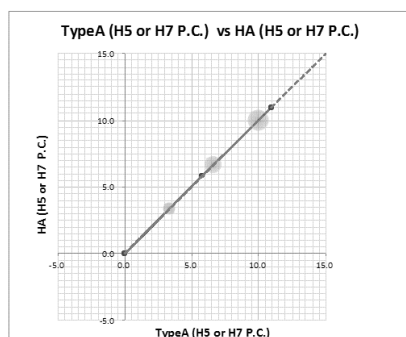
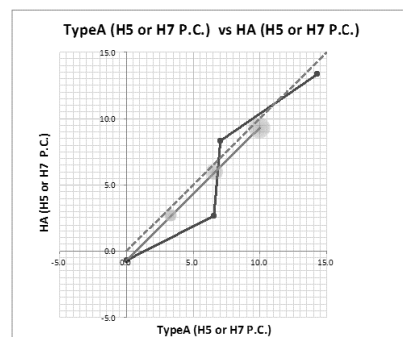
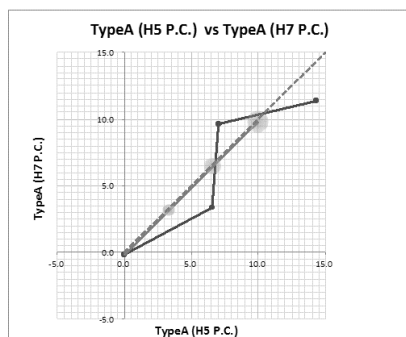


図7 10<sup>2</sup>から10<sup>3</sup>希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている左図の場合、両検出系において各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされています。これは、両方の検出系において、反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

### 2-6. 陽性コントロールの希釈系列が正確に作製できていない

図8(下図左)、9(下図右)の場合、各希釈液の Ct(Cp)値の差が等間隔ではなく、対角線から大きくはずれてプロットされています。正確に希釈系列が作製できていない可能性があり、この場合は、今回の EQA では正確な評価が難しくなります。また、一方の陽性コントロールの10倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図5のようにプロットされ、両方の陽性コントロールの10倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図3のようにプロットされることもあります。



今回の EQA の評価は、今回送付した「解析結果 2013\_地衛研名(Excel ファイル)」の「解析結果」シート中の解析図とアンケート結果から総合的に行いました。「解説」シート中の「解析結果へのコメント」および「その他コメント欄」をご参照下さい。

この「結果の解釈について(PDF ファイル)」と「アンケート、結果記入ファイルからの集計(PDF ファイル)」も参考に、問題があった場合にはトラブルシューティングを行って頂きますようお願い致します。

(添付資料 5)

### アンケートおよび結果記入ファイルからの集計

今回の EQA に参加された 74 地衛研からのアンケートおよび結果記入ファイルの項目を集計し、いくつかの結果を下記にまとめました。

#### 1. 陽性コントロールの保管について

##### 1-1. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図1 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

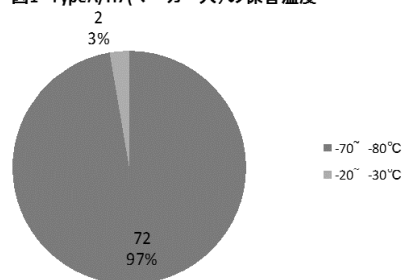
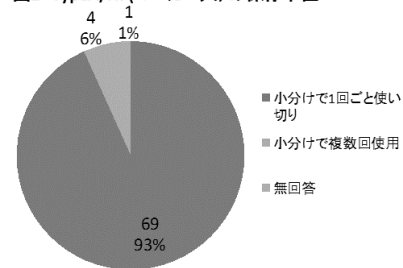


図2 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



##### 1-2. TypeA/H5(マーカー入)の保管について

図3 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

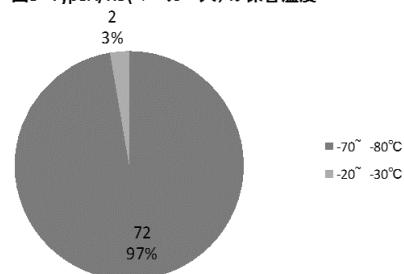
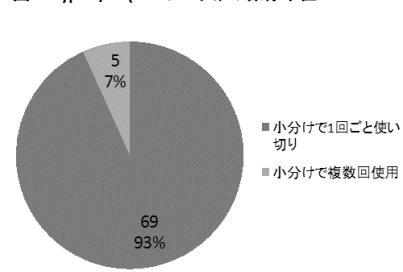


図4 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



#### <コメント>

-20~-30°Cで保管をされている場合は、冷凍庫に自動霜取り機能のないもの（メディカルフリーザー等）を使用されているか、ご確認ください。

また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

(添付資料 5)

2. プライマー、プローブについて

2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

図5 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

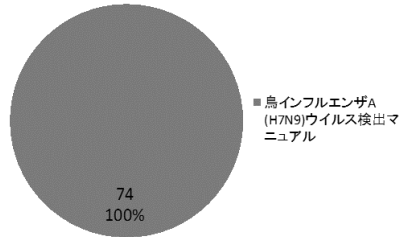


図6 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

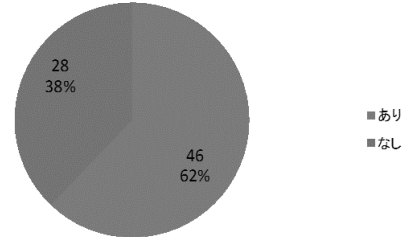


図7 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存温度

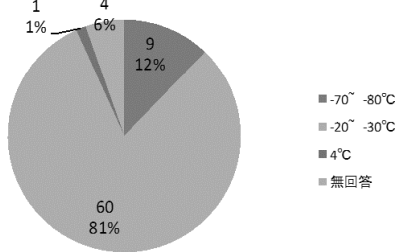
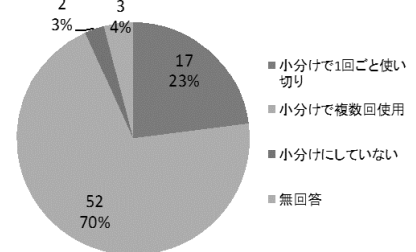


図8 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存単位



2-2. H7 検出系について

図9 H7検出系 記載マニュアル

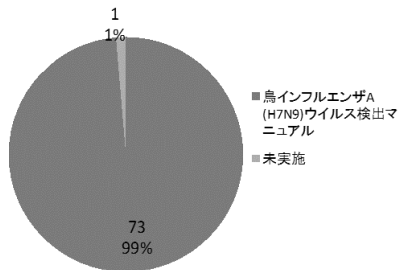


図10 H7検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

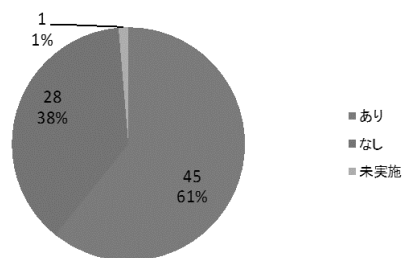


図11 H7検出系 プライマー、プローブ保存温度

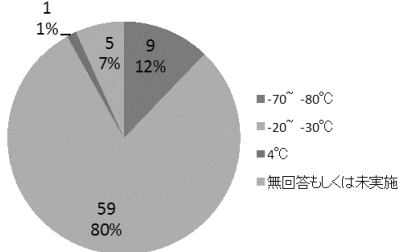
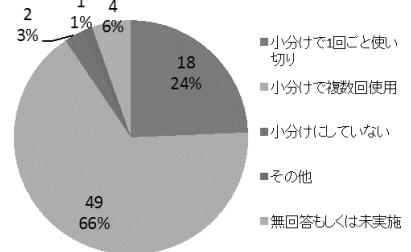


図12 H7検出系 プライマー、プローブ保存単位



(添付資料 5)

2-3. H5 検出系について

図13 H5検出系 記載マニュアル

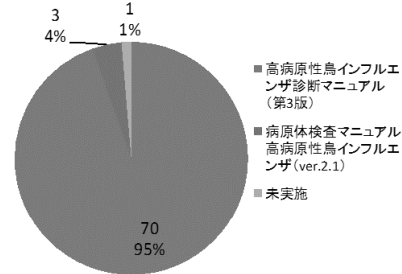


図14 H5検出系 プライマー、プローブプレミックスの有無

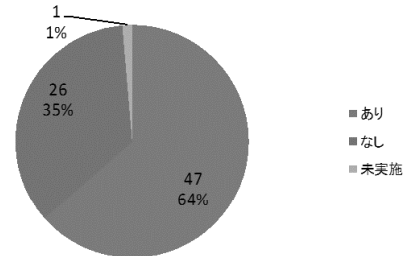


図15 H5検出系 プライマー、プローブ保存温度

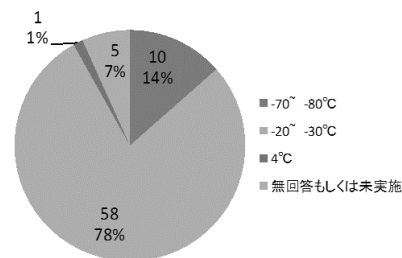
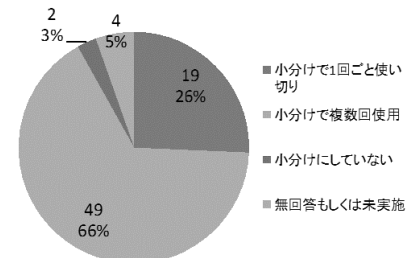


図16 H5検出系 プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

また、H5 検出系において、病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ(ver.2.1)記載の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。この検出系は、2010年10月以降に日本国内の野鳥や家禽で流行した clade2.3.2.1 に対して、H5 検出系が TypeA 検出系の Ct 値と比べ、大きく乖離するため、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)記載の検出系をご使用ください。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図17 使用キット名

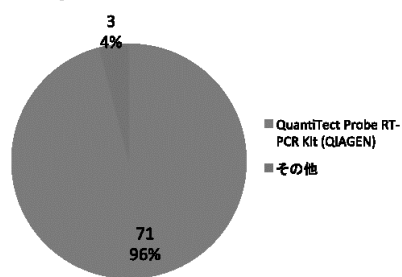
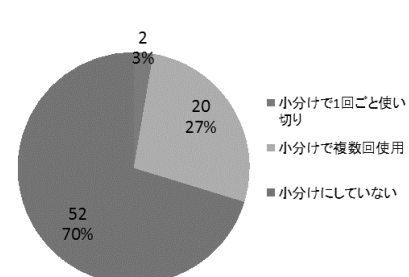


図18 試薬の保存単位

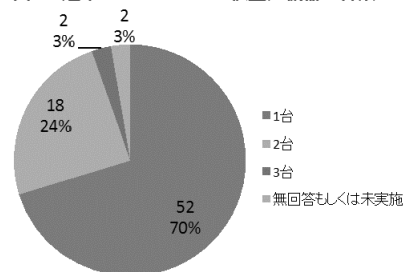


反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布したマニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化されたものです。反応条件、反応組成を最適化していないと、検出感度の低下につながる

(添付資料 5)

可能性もあるのでご注意ください。  
 また、反応時間がより短い試薬をマニュアル内で使用してほしいというご意見をいくつかの地衛研よりいただきました。今後、検討させていただきます。  
 試薬の保存については、小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、コンタミネーションが起きないようにご注意ください。また、凍結融解による劣化により検出感度の低下につながる可能性もありますのでご注意ください。

図20 通常のインフルエンザ検査用機器の台数



4. リアルタイム PCR 機について

図19 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ77機種)

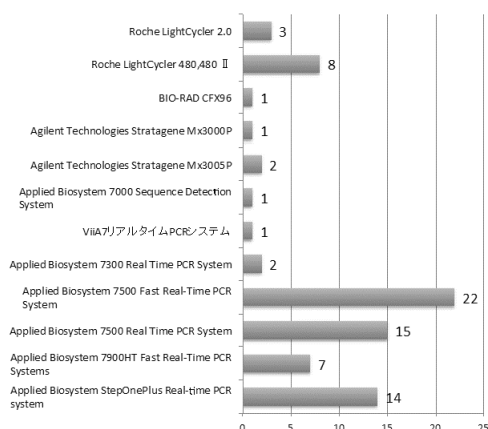


図21 通常検査のバックアップ用機器の台数

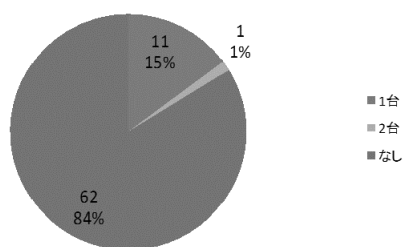
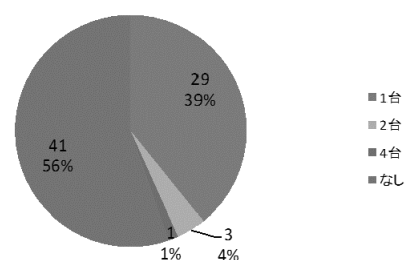


図22 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<コメント>

使用期間の長い装置については、蛍光フィルターの劣化、光学系のずれ、プレートの汚れなどにより正しく測定できない場合がありますので、定期的にメンテナンスを行うことをおすすめいたします。

(添付資料 5)

5. 試薬調製方法について (結果記入ファイルから)

図23 試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時の温度

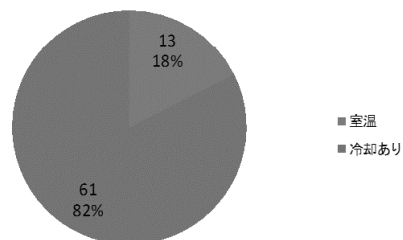


図24 試薬調製と陽性コントロール作製の順 (一人で検査を行った54地衛研)

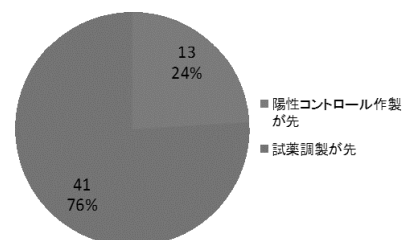
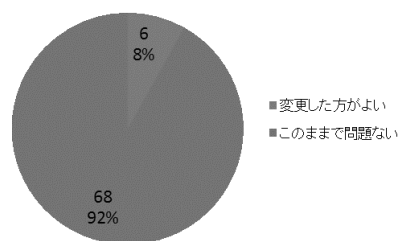


図25 試薬調製過程でのゾーニング



<コメント>

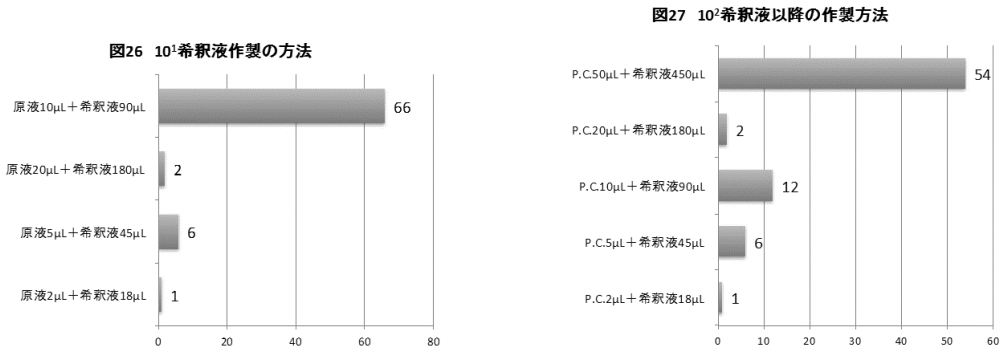
試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時に室温で行っていた地衛研が数カ所ありましたが、氷上での作業をおすすめいたします。

また、一人で EQA を行っていた 54 地衛研のうち、13 地衛研については、陽性コントロール作製後に試薬調製を行っていました。通常の検査でも、同様の順で作業を行っている場合には、反応試薬調製後、陽性コントロール調製を行った方が、陽性コントロールの反応試薬へのコンタミネーションの可能性が低くなります。

試薬調製過程でのゾーニングについては、コンタミネーションの危険性を低減させるうえで、レイアウトの変更をした方がいいと思われる地衛研が数カ所見られました。もし、レイアウトの変更ができない場合には、1 回ごとの検査後にクリーンアップを徹底するなどご留意ください。

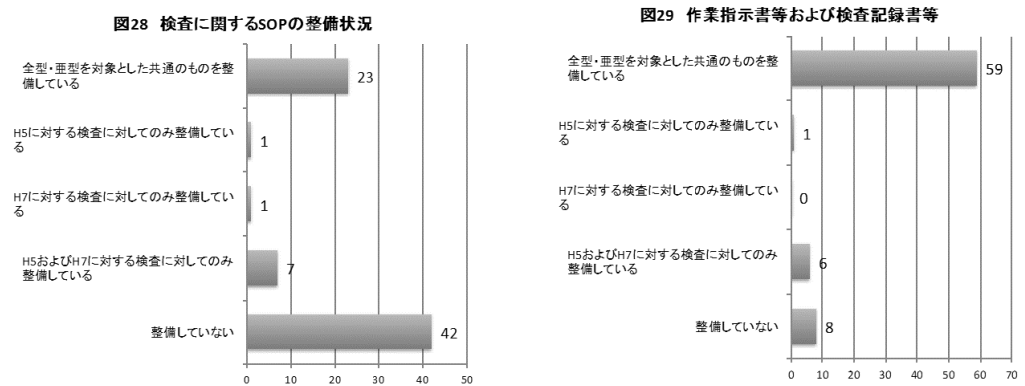
(添付資料 5)

6. 陽性コントロールの希釈方法について (地衛研数で集計)



陽性コントロールの希釈を特に 10<sup>2</sup> 希釈液以降で、50  $\mu$  L + 希釈液 450  $\mu$  L よりも少ない容量で行っている場合、ピペッター由来の誤差が影響しやすく、正確に希釈系列の作製ができなくなる可能性が高くなります。

7. 各所で作成した検査に関する標準業務(作業)手順書(SOP)等や H5, H7 亜型等同定検査の作業指示書等および検査記録書等の整備状況について (地衛研数で集計)



<コメント>

作業手順書および検査記録書等は、ほとんどの地衛研で整備されているが、SOPを整備している地衛研は比較的少ない。

(添付資料 6)

## 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 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)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した。核酸検出検査の精度管理を行う目的は、検査結果の正確性、安定性を担保する事です。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や試薬類は弊所とは同一ではない場合があります、さらに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も異なる可能性が高いため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、各所の検査に対する信頼性を高めるうえで、外部精度管理(EQA)が重要になります。

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 A 型および亜型の核酸検出検査は、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のうち、どれか一つ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 6 検体を配布して、A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査をリアルタイム RT-PCR により行っていただき、お送りいただいた検査結果を詳細に評価して、精度の高い検査が行えているか、行えていないとすればどこに問題があるか、その原因を特定(特定できない場合は推定)し、トラブルシューティング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. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(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ついて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、各所から送付された結果を解析し、検査結果や手順で何らかの問題があった場合やその問題となった原因を特定できた場合(特定できなかった場合は推定)は、「5. 解析結果 2014\_地衛研名(Excel ファイル)」(複数回の検査を行っている場合は、1 つのファイルにまとめました)の「パネル検体の結果」シート中の表および<判定結果について><その他のコメント>にコメントを記載しました。「パネル検体の結果」シートの見



(添付資料 6)

方については「3. 「パネル検体の結果」シートの見方(PDF ファイル)」に示していますのでご参照下さい。

なお、今回配布したパネル検体は、検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 量となっています。何らかの問題があつてこれらが正確に検出できなかった場合は、コメントおよび「2. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(PDF ファイル)」を参考に、ご自身で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。また、これらが検出できていたとしても、検査系に何らかの問題がある可能性が高い地衛研においてはコメントにその旨記載しましたので、同様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。

また、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「4. EQA の結果および結果報告時アンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。アンケート結果から、ほとんどの地衛研で作業指示書等および検査記録書等を整備している事が明らかになりましたが、検査毎や作業者毎に手順や作業場所が異なるケースが散見されました。正確で精度の高い検査を行う上で、作業者全員が共通した手順で検査を行い同じ結果を得られるよう、今一度作業指示書等および検査記録書等を確認し、改めて精度管理を行う事をお勧めします。また、その他にも精度の高い検査を行う上で留意すべき点をコメントとして記載しましたので、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。

本 EQA に関して、トラブルシューティングの方法が分からないなどご不明な点や、ご意見、ご要望などありましたら、下記にお問い合わせ下さい。なお、検査系のトラブルシューティングに必要なプローブやプライマーは少量であれば配布可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さい。

2014 年 12 月 26 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)

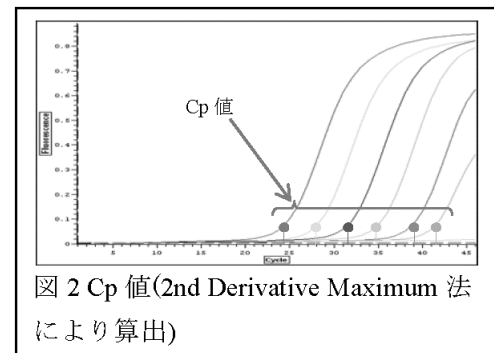
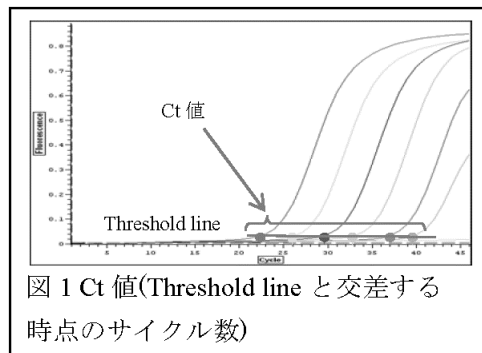
担当 : 影山/高山/中内

(添付資料 7)

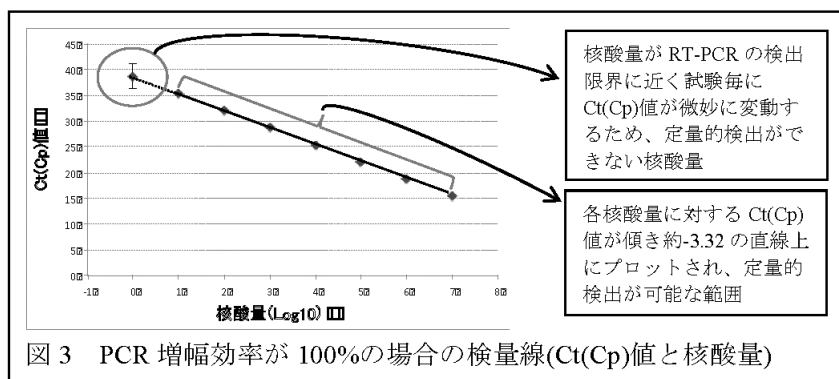
## 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について (問題時のトラブルシューティングについて)

### 1. 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 の指数関数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)。ABI のリアルタイム PCR 装置のソフトウェアでは、通常ベースライン蛍光値の標準偏差の 10 倍の値に Threshold Line が設定され Ct 値が算出されます。一方、Roche LightCycler システムの Auto 解析では、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)値として算出(2nd Derivative Maximum 法)しているため、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 7)

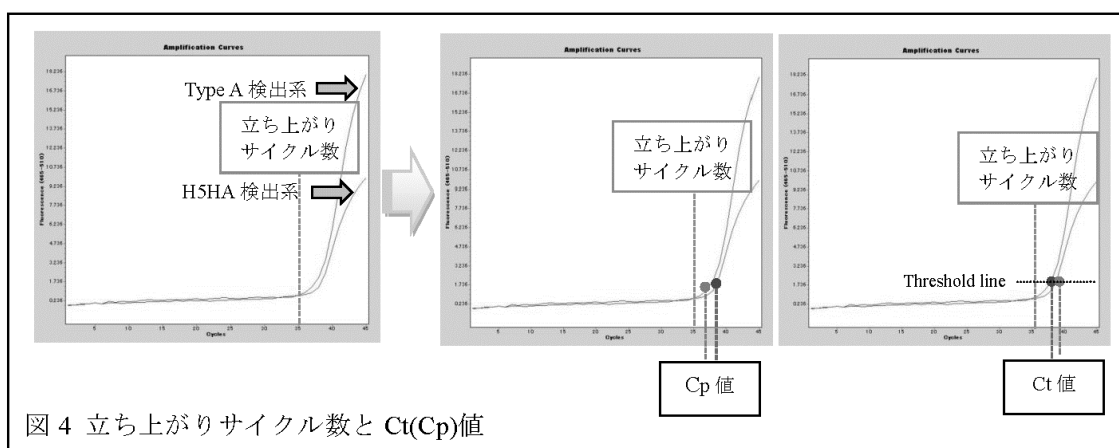
## 2. 精度管理について

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。

## 3. 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(Type A(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。



## 4. 検査手技や微量ピペッターなどの不備について

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)

(添付資料 7)

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。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事をお勧めします。また、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。

- 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、第2項で触れたように、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。後述するように、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

(添付資料 7)

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。

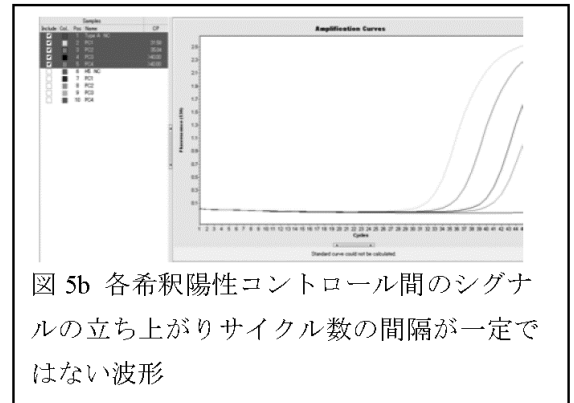
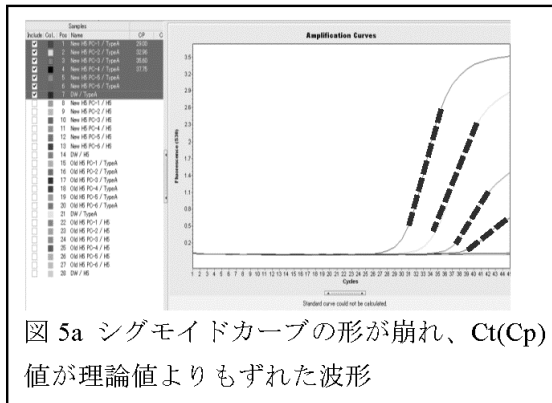
### 5. 検出系に何らかの問題がある場合

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 LightCycler 480 システムの場合では、第 3 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、第 4 項で触れたように、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。

(添付資料 7)

## 6. 検出系に何らかの問題がある場合の具体例およびそのトラブルシューティングについて

先述したように検出系に何らかの問題がある場合は、その原因により現れる現象も異なるため、その現象を解析する事でトラブルシューティングを行う事が可能になる場合があります。以下(1)~(6)に 10 倍階段希釈した H5 および H7 陽性コントロールを用いて検査を行った結果を具体例として示し、原因特定の仕事とその対処方法について解説します。(今回は Roche LightCycler 2.0 システムを使用した場合を例にしていますが、ABI やその他のメーカーの機器を使用した場合も同じ事がいえます)

### (1) プライマー、プローブに何らかの問題がある場合の一例(図 6)

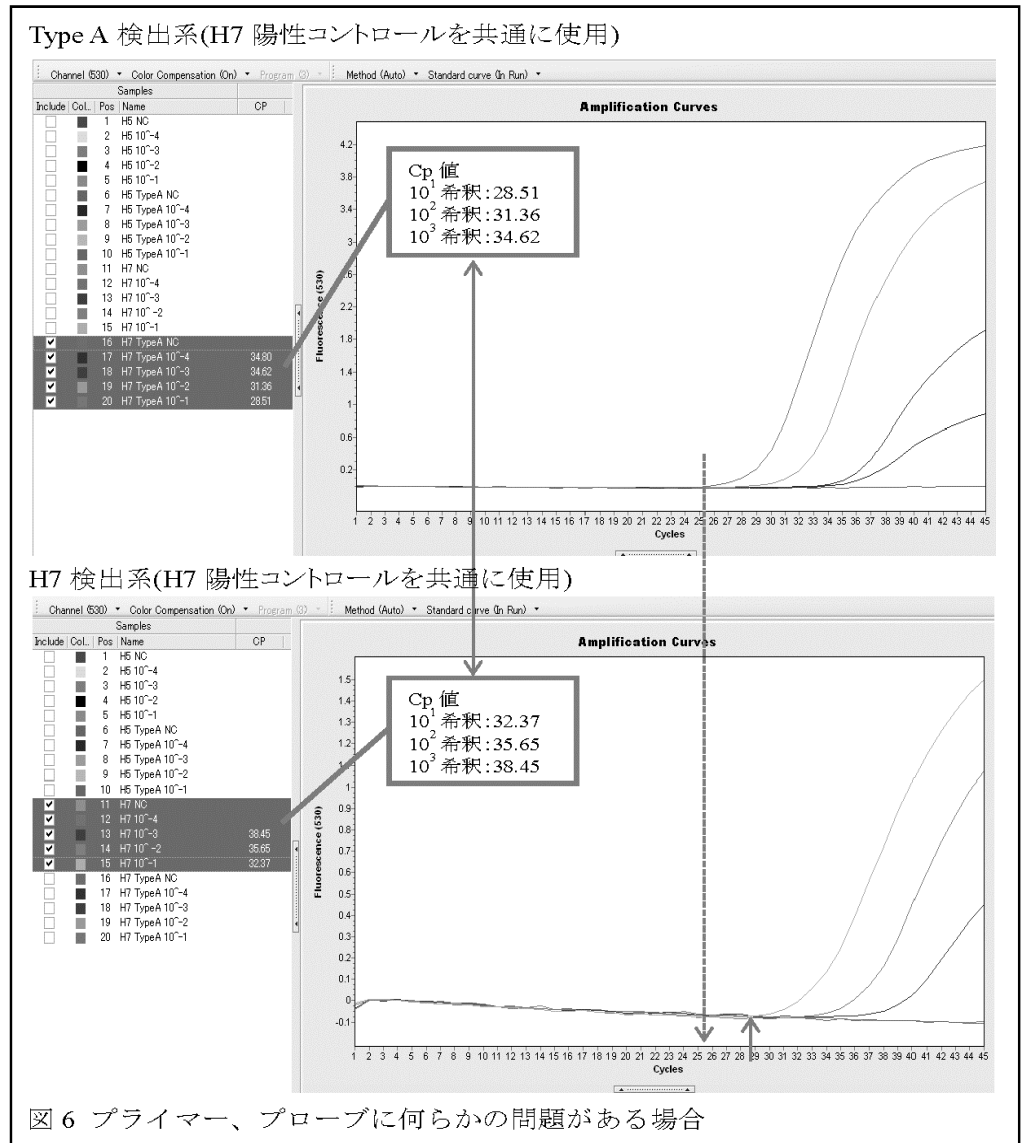
**現象:** 同じ H7 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、波形を見ると H7 検出系の立ち上がりのサイクル数が Type A 検出系に比べると大きく遅れている (Cp 値も H7 検出系の方が Type A 検出系に比べ大幅に大きくなっている)。

**原因:** H7 検出系に何らかの問題があったため、シグナルの立ち上がりサイクル数が Type A 検出系よりも遅れたと考えます(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)。このようなケースでは、プライマー、プローブに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濃度調整が不正確
- 対処方法:** 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。具体的には、まずはプライマーのみを新旧で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。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を新旧で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)。

(添付資料 7)



(添付資料 7)

(2) 陽性コントロールの希釈系列作製で不備がある場合の一例(図 7)

現象： H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて、Type A および H5 検出系の検査を行っていますが、どちらの系も  $10^1$  希釈液と  $10^2$  希釈液および  $10^2$  希釈液と  $10^3$  希釈液の間の立ち上がりサイクル数の間隔がそれぞれ一定ではなく、想定される範囲内(理想値は 3.32)になっていないにもかかわらず、同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔はどちらの系もほとんど一致している。

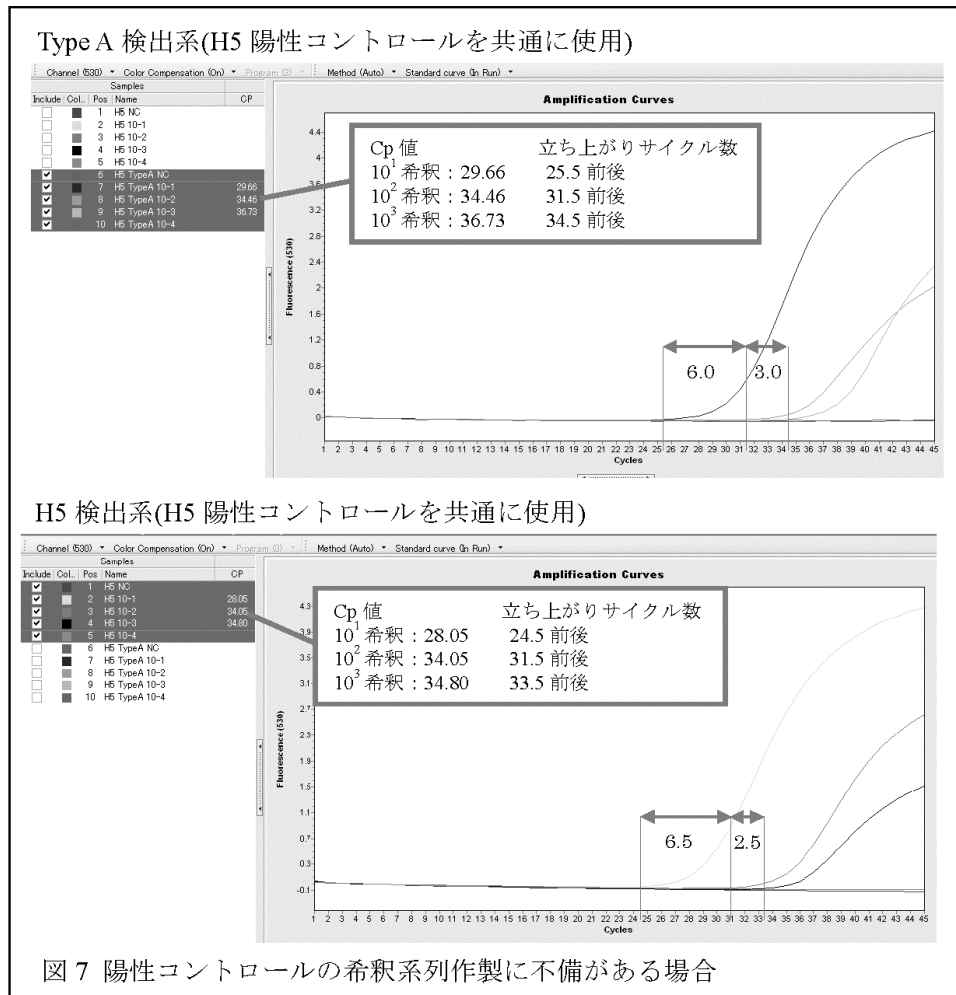


図 7 陽性コントロールの希釈系列作製に不備がある場合

原因： 10 倍階段希釈の陽性コントロールであるにも関わらず、それぞれの立ち上がりサイクル数\*の間隔が一定ではなく、さらに Type A および H5 検出系間で同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔が同程度であることから(この例では、Type A および H5 検出系の  $10^1$  希釈液と  $10^2$  希釈液の立ち上がりサイクル数の間隔は約 6.0 および約 6.5、 $10^2$  希釈液と  $10^3$  希釈液の間隔は約 3.0 と約 2.5)、陽性コントロールの希釈が正確にできなかった可能性が高



(添付資料 7)

いと考えられます。また、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が Type A 検出系とほぼ同じ値 (この例では、Type A および H5 検出系の立ち上がりサイクル数は、 $10^1$  希釈液それぞれで約 25.5 および約 24.5、 $10^2$  希釈液でどちらも約 31.5)であるため、反応試薬調製時に何らかの問題があった、あるいはプライマー・プローブに問題があったとは考えにくく、単に陽性コントロールの希釈が正確ではなかったために、このような現象が見られたと考えられます。

\* この例の場合、特に Type A の  $10^2$  希釈液の増殖曲線の形が、 $10^1$  希釈液と比べると、X 軸の方向に寝てしまったため、Cp 値は比較的小さく算出されます。このように、増殖曲線の形が通常とは異なる場合も、その Cp 値と立ち上がりサイクル数の間に相関性がなくなってしまうため、結果解析を行う際は Cp 値のみの確認ではなく、増殖曲線の形や立ち上がりサイクル数についても確認する必要があります。

対処方法：このような場合の多くは、第 4 項で解説したように、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に不備があった可能性が高いため、まずは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に習熟する必要があります。なお、陽性コントロールの正確な希釈を行うには、少なくとも  $10\mu\text{L}$  以上の陽性コントロール液を分取・分注して、希釈液の作製を行う事をお勧めします。例えば、 $2\mu\text{L}+18\mu\text{L}$  の希釈よりも  $50\mu\text{L}+450\mu\text{L}$  の希釈の方が、同じ希釈倍率でもより誤差の少ない分取・分注を行う事ができます。希釈を行う際はできるだけ大きなスケールで行う事をお勧めします。また、陽性コントロールの希釈手順や使用している陽性コントロールの濃度等が間違っていないかどうか、検査マニュアル等もご確認下さい。

(3) 陽性コントロールもしくは反応試薬を反応槽に添加する際に不備がある場合の一例(図 8)

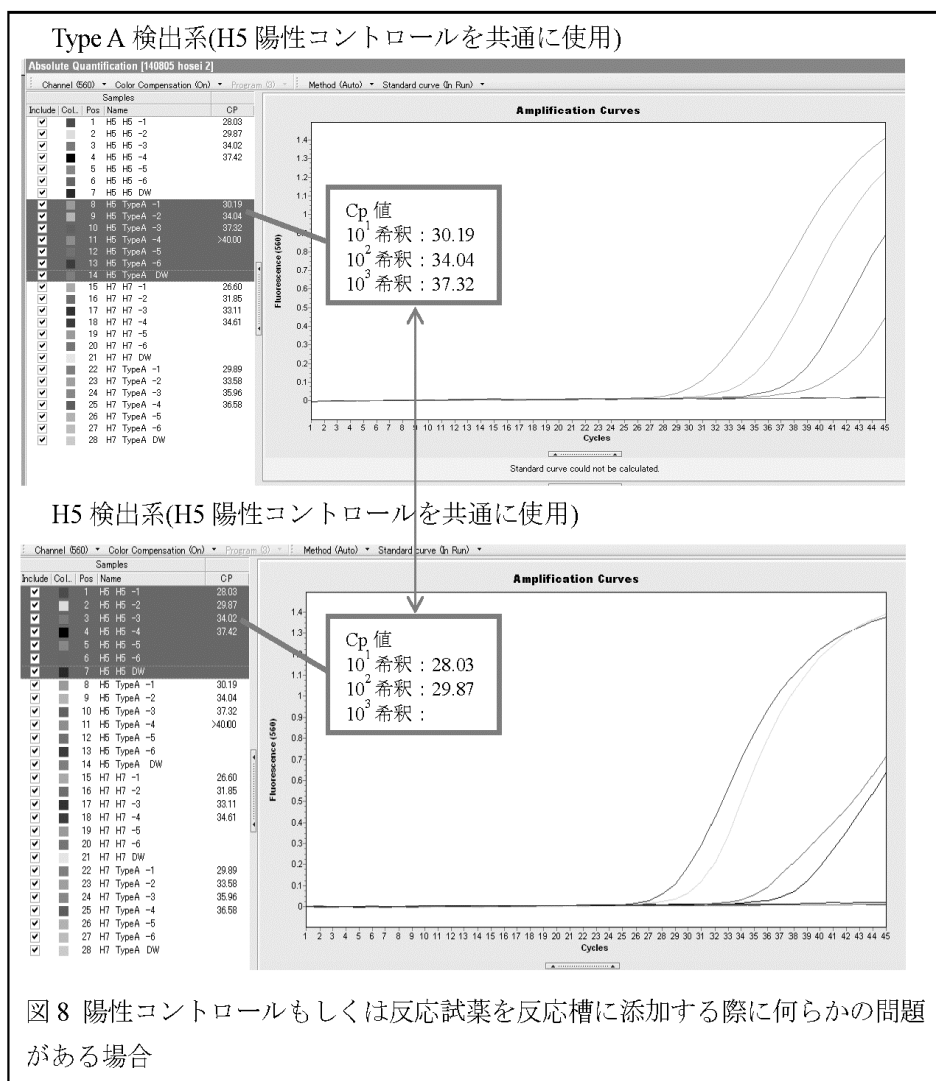
現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて検査を行ったにも関わらず、希釈した陽性コントロールの間の Type A 検出系の Cp 値の間隔は想定される範囲内であり、ほぼ等間隔であるにもかかわらず、H5 検出系の Cp 値は等間隔になっておらず、波形も少し乱れている。また、 $10^1$  希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数および Cp 値の間に若干乖離 (Type A が H5 検出系より遅れる) が見られる。

原因：Type A 検出系の結果から、陽性コントロールの  $10^1$ 、 $10^2$  希釈液の Cp 値の間隔がほぼ理想値であるため、陽性コントロールの希釈については特に問題はないと考えられます。しかし、 $10^1$  希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数もしくは Cp 値の間に若干の乖離があり、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題があった可能性が考えられます。また、H5 検出系においては、 $10^2$  希釈以下で Cp 値やシングモイドカーブが乱れているため、陽性コントロールを反応槽に添加する際に正確な量の分注ができなかった、あるいは H5 検出系反応試薬調製時の混合が十分でなかったなどの可能性も考えられます。

対処方法：この場合も、一部で微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取り扱いに不備があったと考えられますので、まずは、微量ピペッターの操作およびマイクロチュー

(添付資料 7)

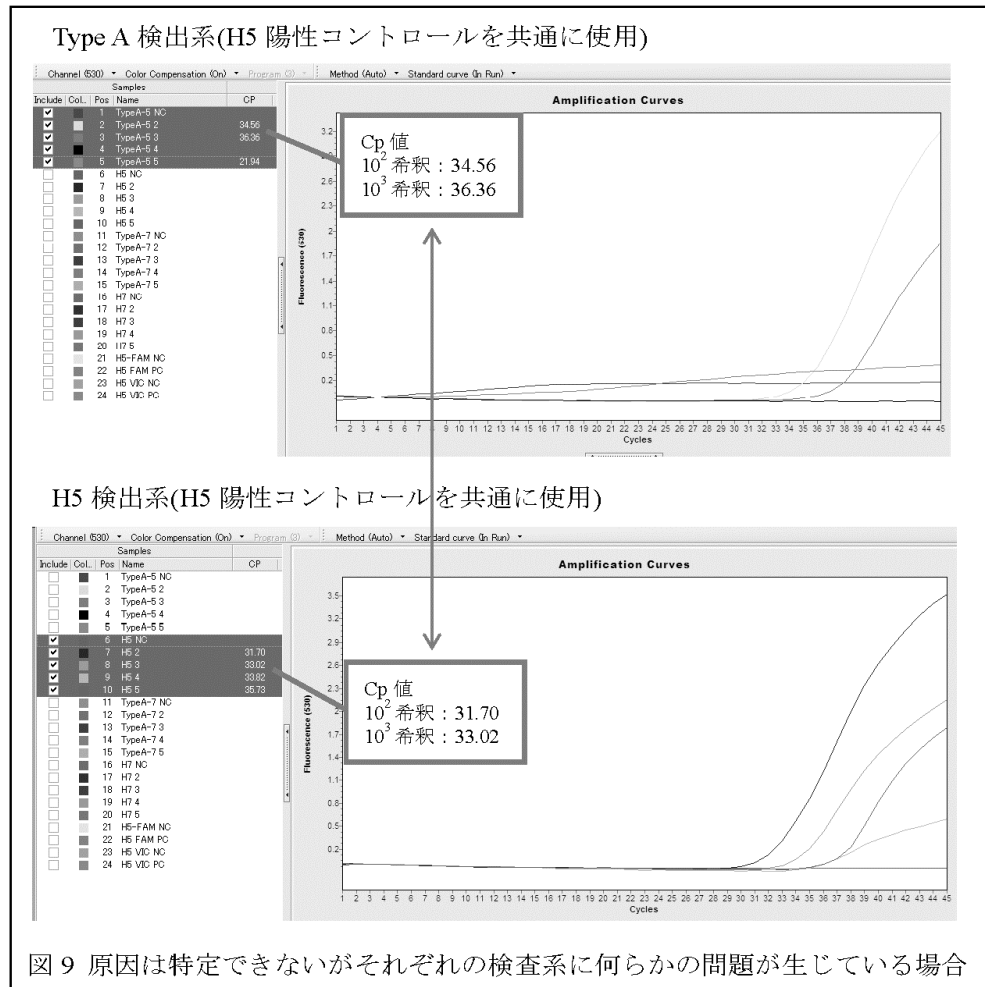
ブの取り扱いに習熟する必要があります。また、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題がある場合は、第 6.(1)項で解説したような対応が必要になります。



(添付資料 7)

(4) 原因は特定できないがそれぞれの検査系に何らかの問題が生じている場合の例(図 9)

現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、同希釈の陽性コントロールに対し、Type A 検出系、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が揃っておらず、それぞれの波形も乱れている。



原因：反応試薬調製時に微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取り扱い等に不備があったのか、プライマー、プローブに何らかの問題があったのか、そのどちらか一方あるいはその両方が関連していると考えられるのか、この例だけでははっきりとした原因の特定が難しい。

対処方法：まずは、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に習熟し、手技に問題がない状態で第 6.(1)項の要領でプライマー・プローブのチェックを行います。

(添付資料 7)

(5) 作業者により結果がばらつく

同一の陽性コントロールと試薬を使用しているにも関わらず、検査結果が各人で異なる場合は、各人の手技の違いや手順の違いが大きく影響している可能性が考えられます。他にも、各作業で使用するマイクロチップ、マイクロチューブ、微量ピペッターが統一されていない場合や、作業手順が統一されておらず同じ検査であっても各人で検査手順が異なる場合、同じ作業でも各人が使用する微量ピペッターが異なる場合など、検査手順や使用する機材の相違が原因となっている可能性も考えられます。

特に、作業者毎に異なる微量ピペッターを使用している施設では、たとえ各人が同じ作業を正確に行ったとしても、各ピペッターの精度が異なっていれば、分取・分注量もピペッター毎に異なるため、作業者毎に結果がばらつく可能性があります。

各人が微量ピペッターの操作やマイクロチューブの取り扱いに習熟する事が前提になりますが、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して共用するなど、機材等の使用に関しては統一・共用化を図る、作業者により検査手順が異なっているところがないか関係者全員で再確認を行う、標準業務(作業)手順書を作成して検査手順の統一を図る、等の対応が必要と考えられます。

(添付資料 8)

## EQA の結果および結果報告時アンケートの集計

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 72 地衛研からの結果報告時アンケートにお寄せいただいた回答を集計し、いくつかの項目について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、ほぼ全ての地衛研が全ての検体に対して、亜型同定を正確に行う事ができていました。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。

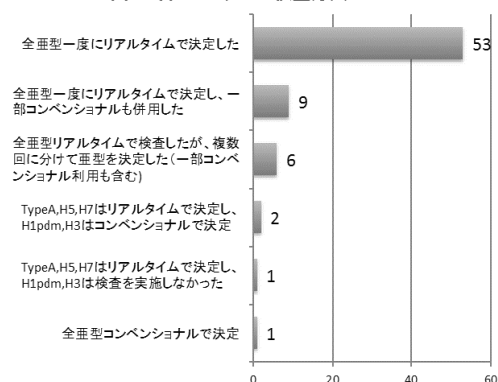
また、複数の作業員で EQA を実施した地衛研の中には、検査項目や作業内容等が作業員によって異なるケースも散見されました。作業員全員が同じ結果を得られるよう、また再現性良く正確で精度の高い検査を行うためにも、今一度、標準業務(作業)手順書や作業指示書等および検査記録書等を確認し、作業員間で統一した手順で検査を行う事をお勧めします。

パネル検体	亜型	濃度 (copies/μL)	正答数*	同定数**
A	H5N1	200	72/72 (100%)	72/72 (100%)
B	Negative		72/72 (100%)	72/72 (100%)
C	H7N9	20	72/72 (100%)	72/72 (100%)
D	H1N1pdm09	20	72/72 (100%)	71/71 (100%)
E	H5N1	20	71/72 (99%)	71/72 (99%)
F	H3N2	20	71/72 (99%)	70/71 (99%)

\*正答数については、各パネル検体に対して、各所で実施した検査の範囲内で導き出される結果を正答として算出した。

\*\*同定数については、各パネル検体に対して、亜型まで導き出されている結果を算出した。

図1 今回のEQAでの検査方法



\*全亜型とは、H5,H7,H1pdm,H3 亜型を指します。

\*\*リアルタイムはリアルタイム RT-PCR 法、コンベンショナルはコンベンショナル RT-PCR 法を指します。

### 2. プライマー、プローブについて

#### 2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

図2 Type A (M 遺伝子)検出系 記載マニュアル

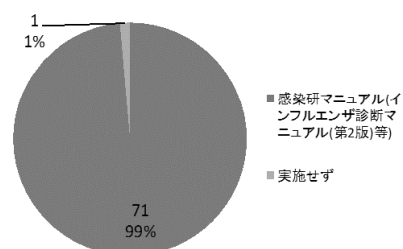
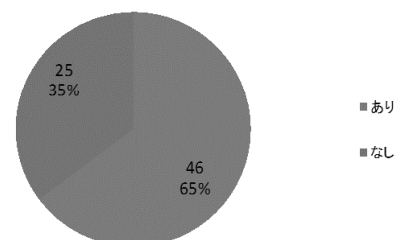


図3 Type A (M 遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無



(添付資料 8)

図4 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存温度

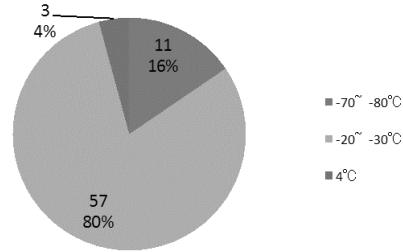
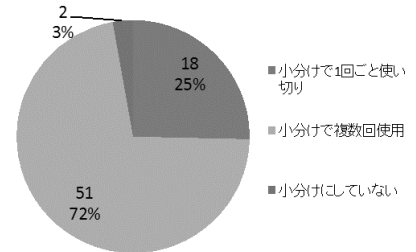


図5 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H5 検出系について

図6 H5検出系 記載マニュアル

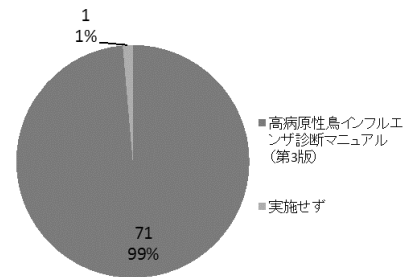


図7 H5検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無

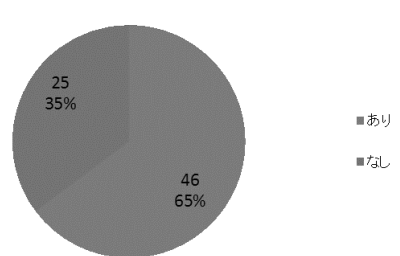


図8 H5検出系  
プライマー、プローブ保存温度

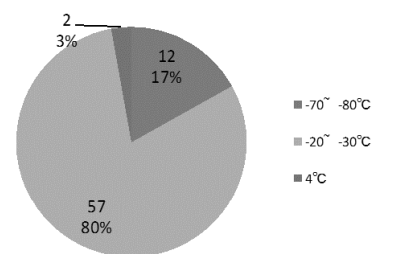
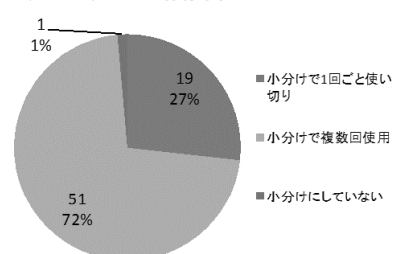


図9 H5検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H7 検出系について

図10 H7検出系 記載マニュアル

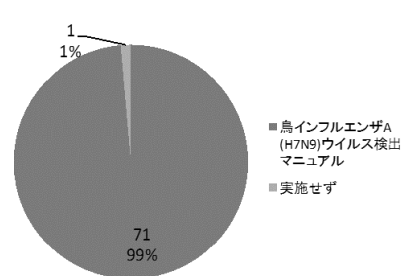
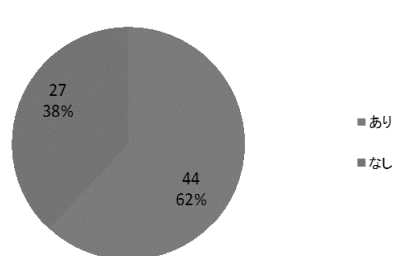


図11 H7検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無



(添付資料 8)

図12 H7検出系  
プライマー、プローブ保存温度

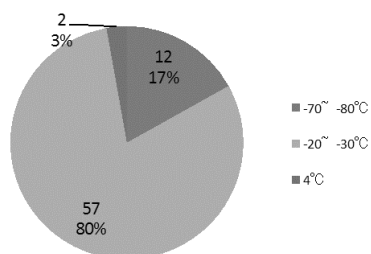
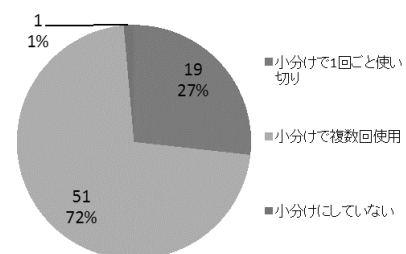


図13 H7検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-4. H1pdm 検出系について

図14 H1pdm検出系 記載マニュアル

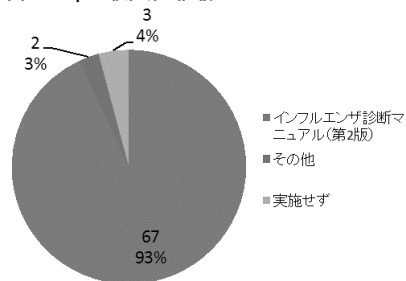


図15 H1pdm検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無

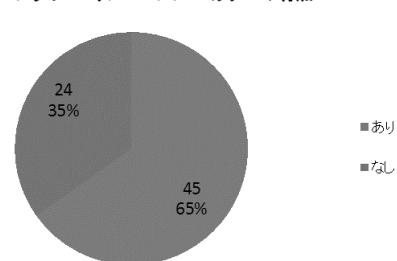


図16 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存温度

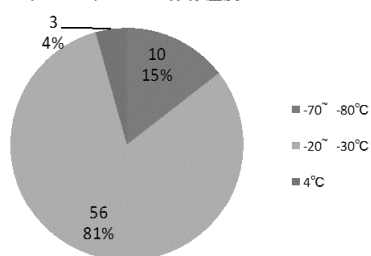
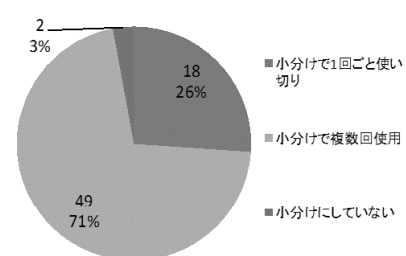


図17 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-5. H3 検出系について

図18 H3検出系 記載マニュアル

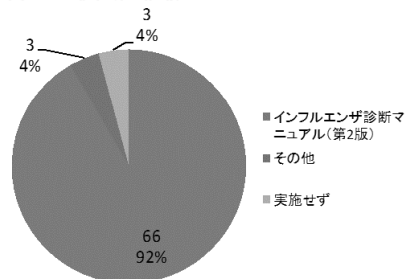
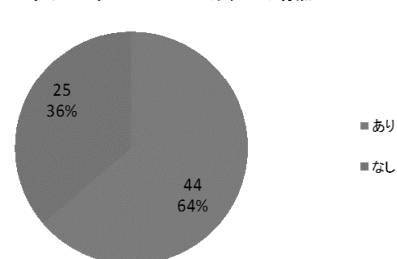


図19 H3検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無



(添付資料 8)

図20 H3検出系  
プライマー、プローブ保存温度

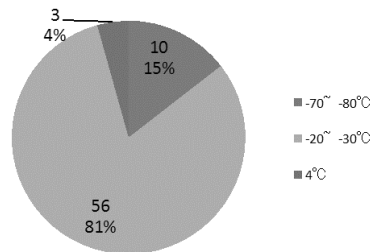
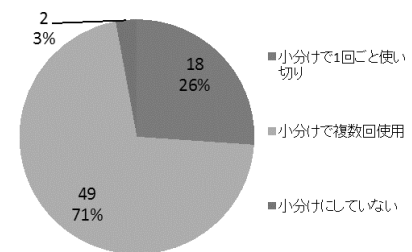


図21 H3検出系  
プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

プライマー、プローブを小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解により劣化につながる可能性がありますので、小分けにして1回ごとに使い切りにする事をお勧めします。

また、プライマー、プローブプレミックスをあらかじめ作製していない場合には、極少量のプライマーやプローブを微量ピペッターで分取する事になりますので、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ばらつき、同じサンプルであっても検査結果が同じにならない可能性があります。プライマー、プローブのプレミックスをあらかじめ作製し、小分け分注をして自動霜取り機能のない冷凍庫(メディカルフリーザー等)で冷凍保管する事をお勧めします(できれば-70°C以下での保存を推奨します)。

また、H1pdm および H3 検出系において、インフルエンザ診断マニュアル(第2,3版)記載の検出系より以前の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。最近の流行株を検出できるようにするためにも、最新のバージョンの検出系を使用する事をお勧めします。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図22 使用キット名

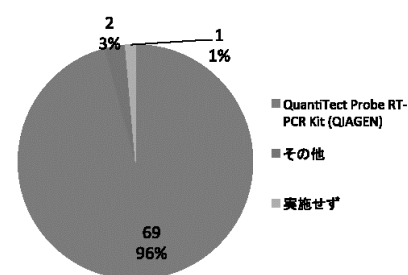
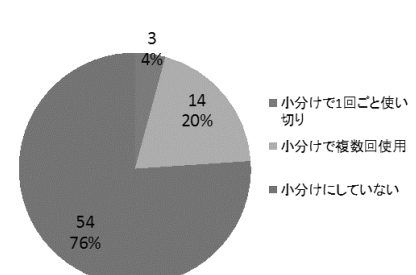


図23 試薬の保存単位



反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布マニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化しています。他の試薬を同じ条件で使用した場合、検出感度や特異性が低下する可能性がありますので、反応条件、反応組成の最適化を行っていただく事をお勧めします。

試薬の保存と使用についてですが、小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解の影響で試薬の劣化による検出感度の低下やコンタミネーションが起きる可能性が高くなりますのでご注意ください。

4. 陽性コントロールの保管について

4-1. TypeA/H5(マーカー入)の保管について



(添付資料 8)

図24 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

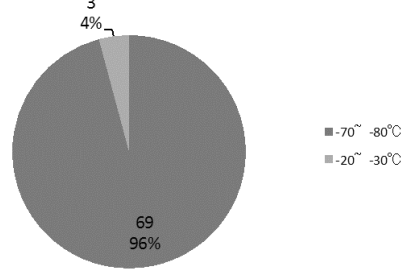
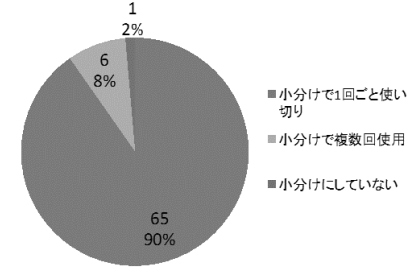


図25 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



4-2. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図26 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

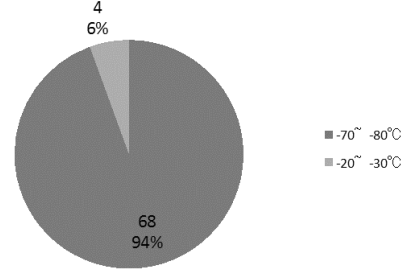
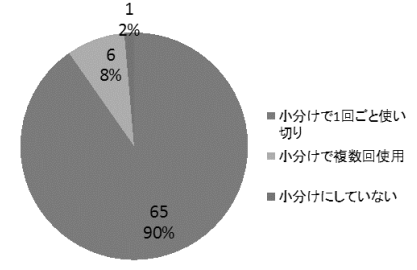


図27 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



4-3. TypeA/H1pdm の保管について

図28 TypeA/H1pdmの保管温度

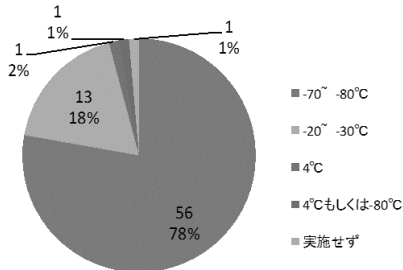
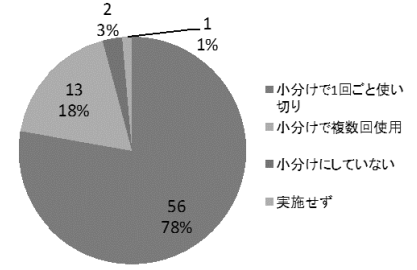


図29 TypeA/H1pdmの保存単位



4-4. TypeA/H3 の保管について

図30 TypeA/H3の保管温度

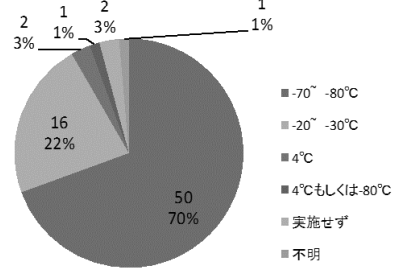
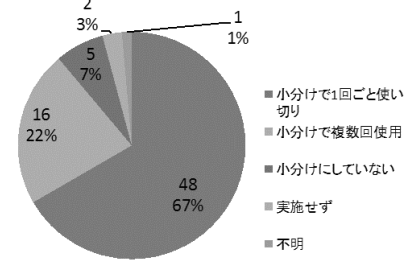


図31 TypeA/H3の保存単位



<コメント>

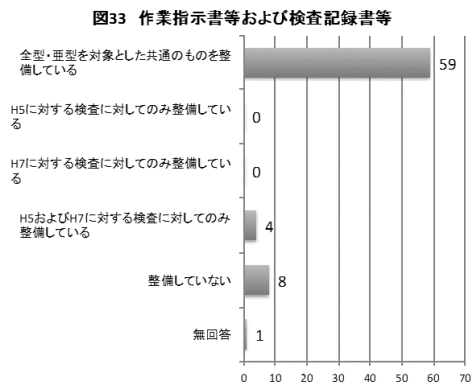
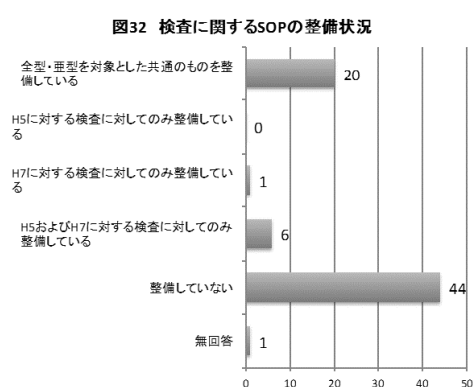
TypeA/H5、TypeA/H7(マーカー入)陽性コントロールは、必ず-70°C以下での保管をお願いいたします

(添付資料 8)

す。また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解による劣化につながる可能性がありますのでご留意下さい。

TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA については、保存温度が-20~-30℃や4℃である場合、また、小分けで複数回使用されている場合が多い傾向にありました。一般的に RNA は-70 度以下での保管が推奨されています。TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA につきましても、TypeA/H5、TypeA/H7 陽性コントロールと同様の方法で保管する事をお勧めします。

5. 各所で作成した検査に関する標準業務(作業)手順書(SOP)等や H5、H7 亜型等同定検査の作業指示書等および検査記録書等の整備状況について (地衛研数で集計)



<コメント>

作業指示書および検査記録書等は、ほとんどの地衛研で整備されている一方で、SOP を整備している地衛研は比較的少ない傾向にありました。

6. リアルタイム PCR 機について

図34 通常のインフルエンザウイルスの検査で使用しているリアルタイムPCR機の機種 (のべ76機種)

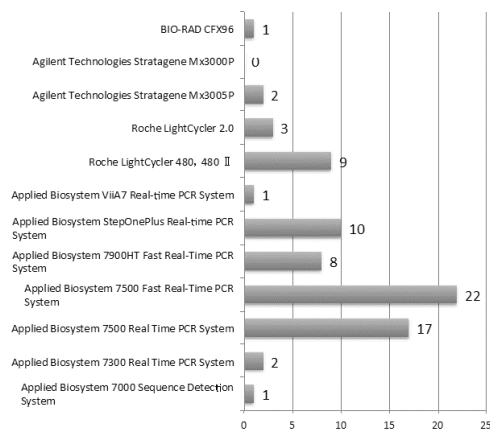
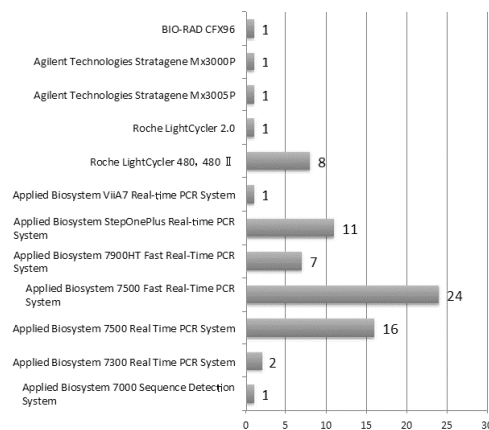


図35 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ74機種)



(添付資料 8)

図36 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

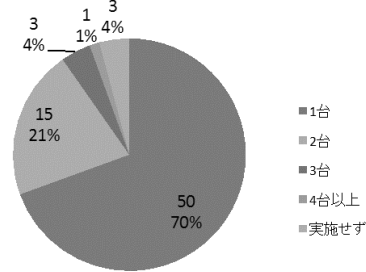


図37 通常検査のバックアップ用機器の台数

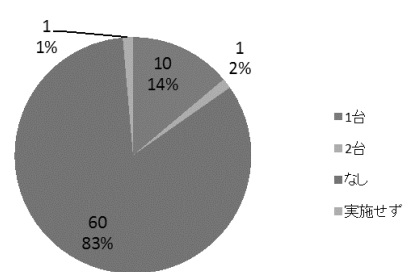
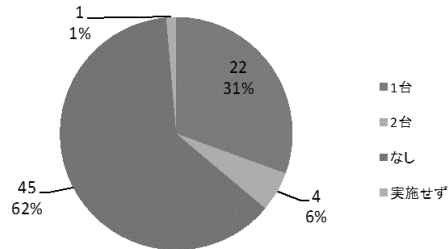


図38 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<コメント>

使用期間の長い装置については、蛍光フィルターの劣化、光学系のずれ、プレートの汚れなどにより正しく測定できない場合がありますので、定期的にメンテナンスを行う事をお勧めします。

ほとんどの地衛研で、今回のEQAを通常のインフルエンザ検査用機器で実施していました。通常検査のバックアップ用機器やパンデミック時用機器についても、通常のインフルエンザ検査用機器と同等の結果が得られることを定期的に確認する事をお勧めします。

(添付資料9)

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した。

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9)

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していただき、貴所の検査精度管理にお役立て頂けますと幸いです。

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

(添付資料9)

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

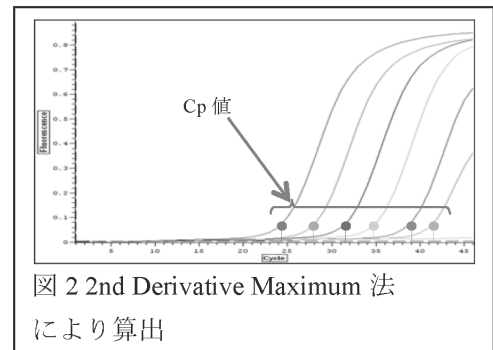
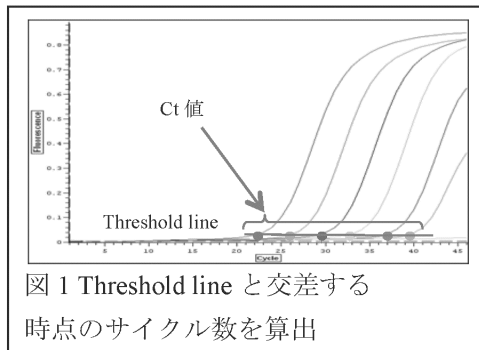
(添付資料 10)

## 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて

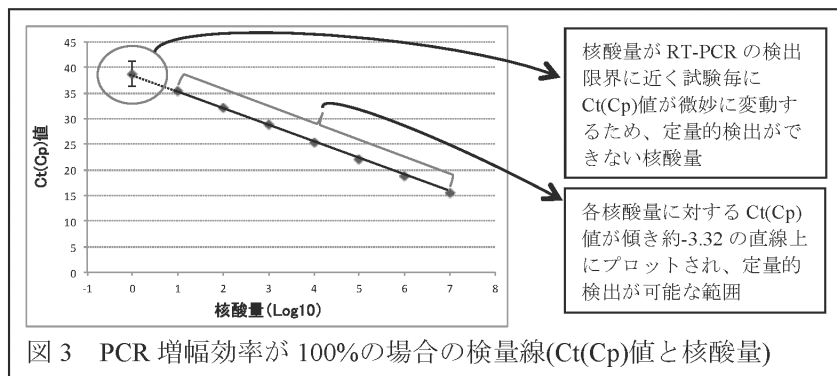
### 精度管理について

#### 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 の指数関数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)。

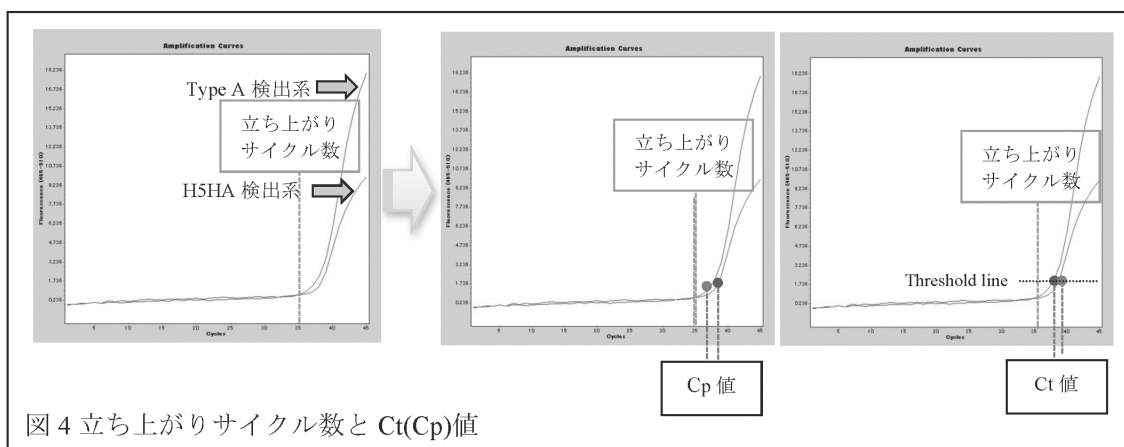


(添付資料 10)

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、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 10)

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に分取・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。

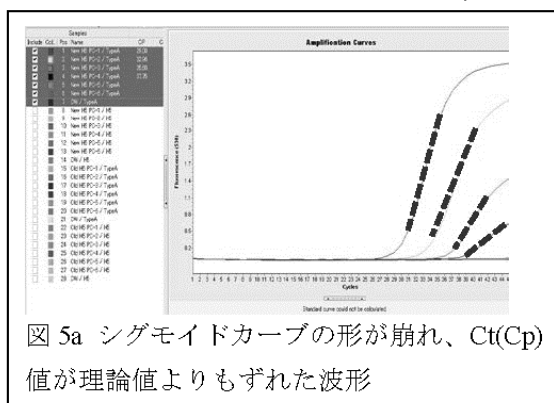


図 5a シグモイドカーブの形が崩れ、Ct(Cp)値が理論値よりもずれた波形

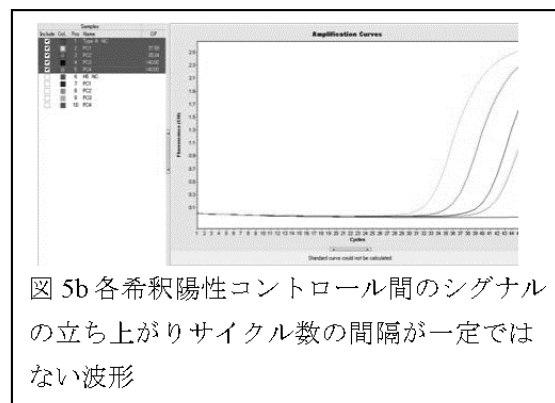


図 5b 各希釈陽性コントロール間のシグナルの立ち上がりサイクル数の間隔が一定ではない波形

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、また作業者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 10)

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 10)

- ✓ 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 10)

- 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、鑄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 10)

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 10)

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 10)

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。

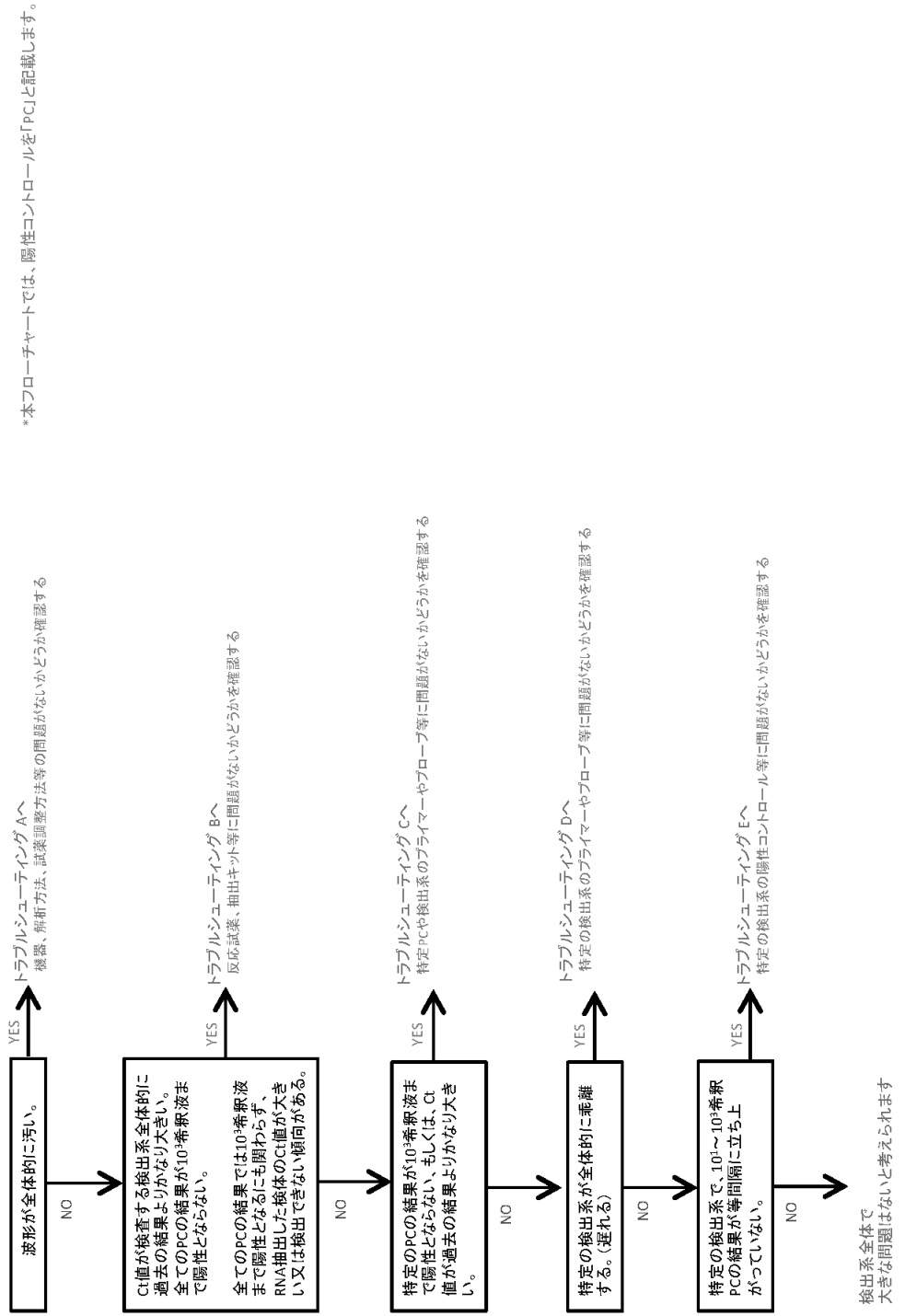
他の検体では複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られない場合などは、検体間のクロスコンタミネーションの可能性が低いと考えられます。その場合は、対象検体のみを再度 RNA 抽出から行い、再検査(他の検体と同時に検査しない)を行って、同じ結果が得られるかどうか確認する事をお勧めします。

**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。

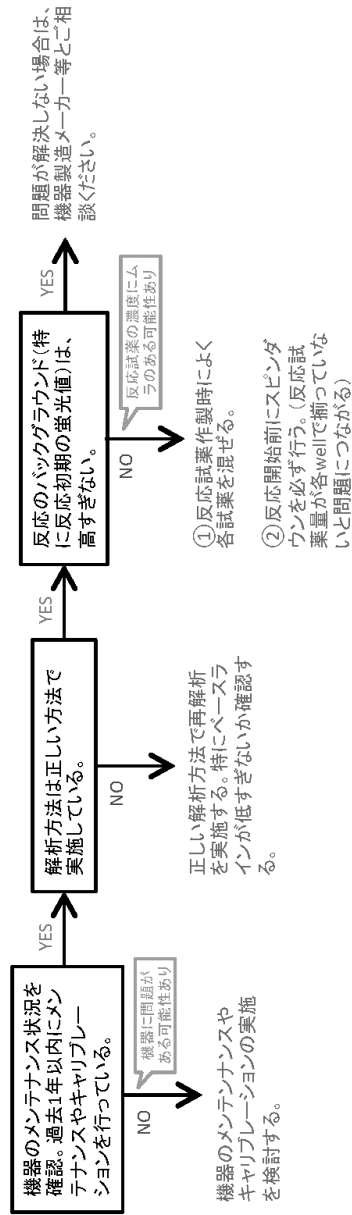
(添付資料11)

- \* 問題は、何度も同じように発生していますか？まずは、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。

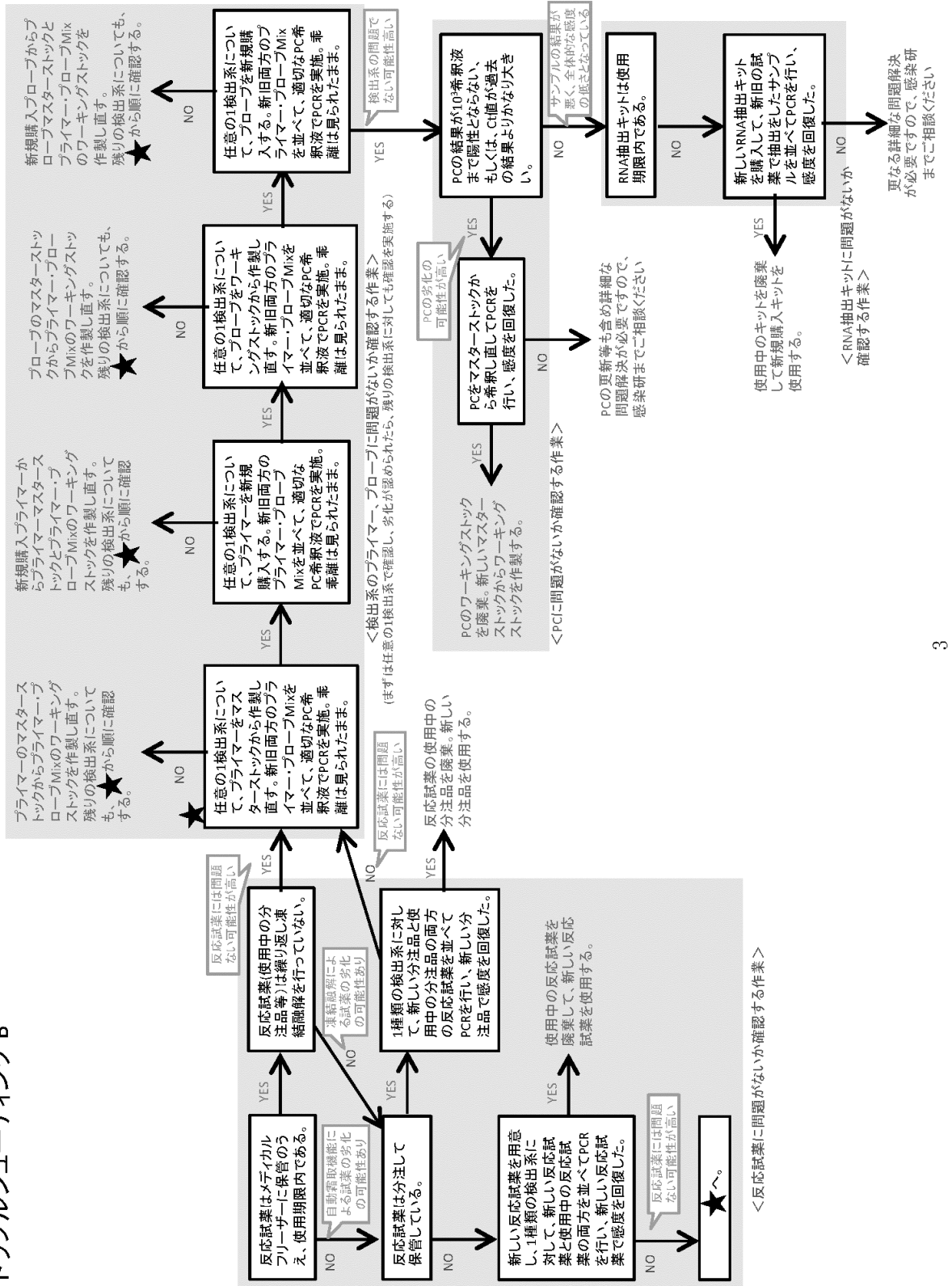




(添付資料11)  
 トラブルシューティング A



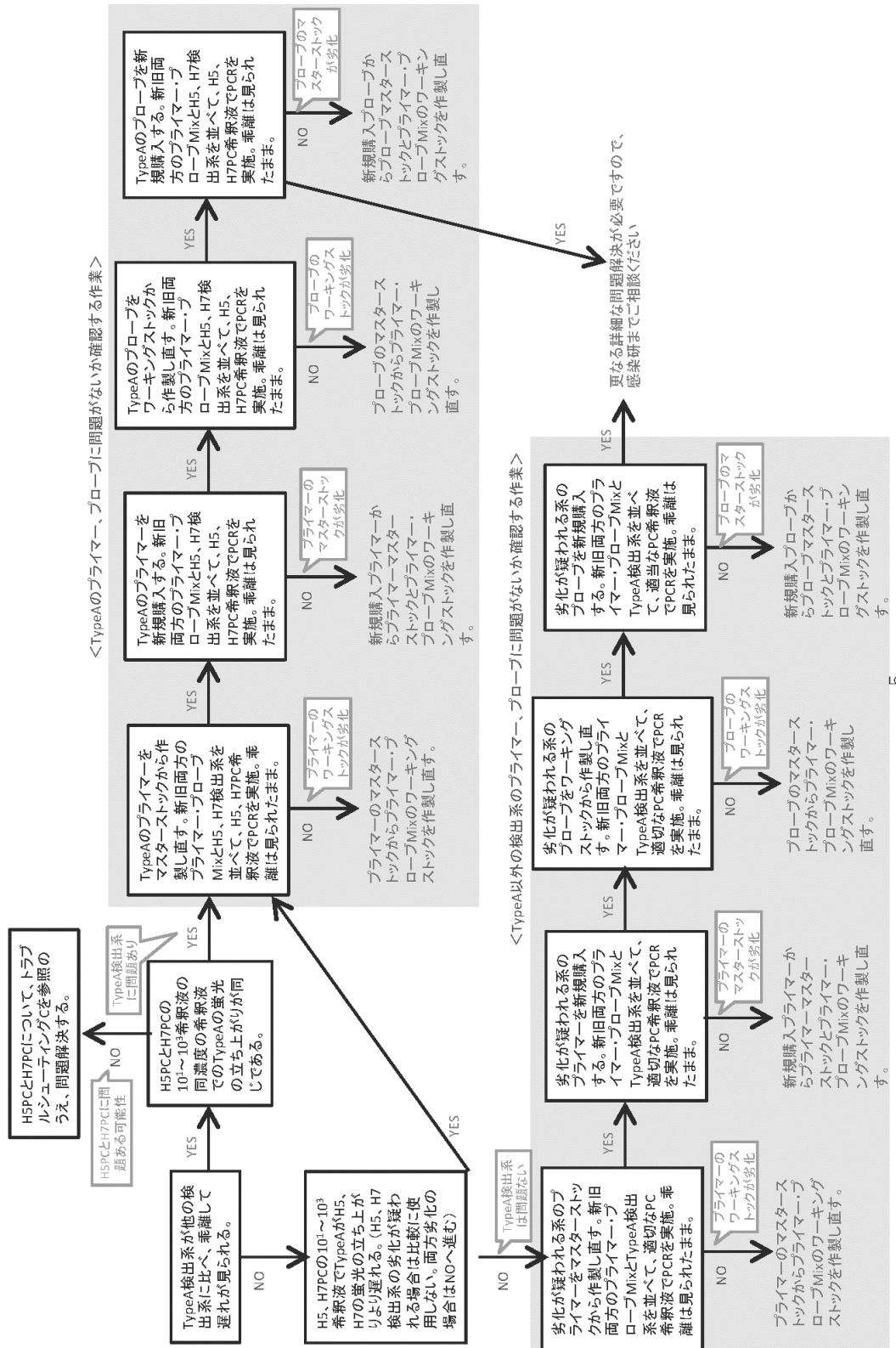
(添付資料11)  
トランプルシチュエーション B





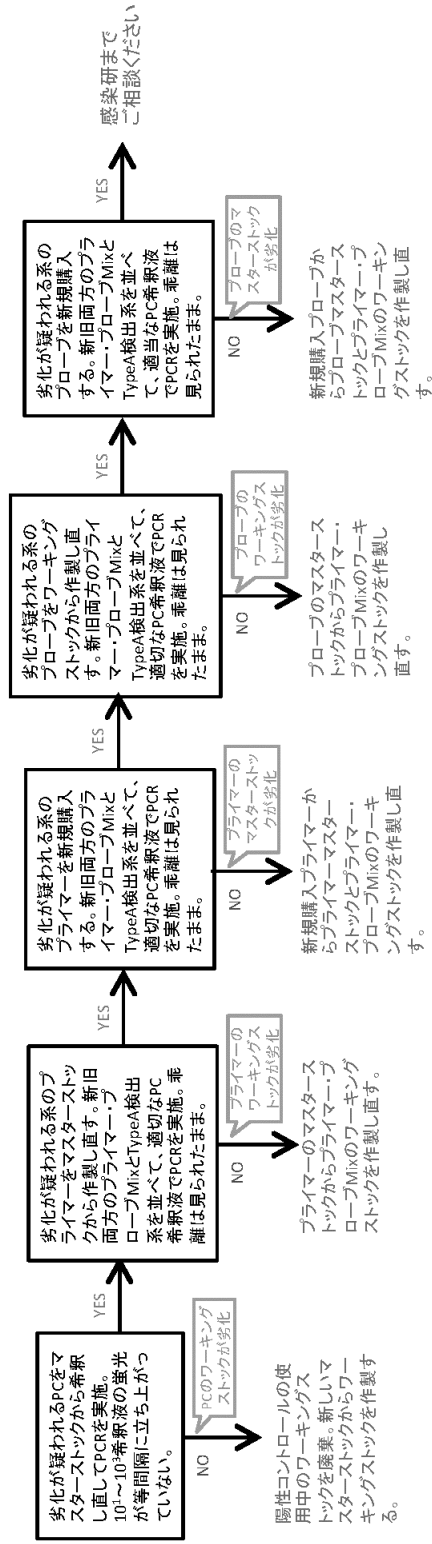
(添付資料11)  
 トラブルシューティングD

\* TypeAを基準検出系として各垂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11)  
**トラブルシューティング E**

\* トラブルシューティング前に、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。



### 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。

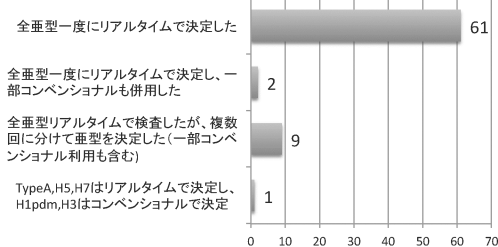
表1 今回のEQAの正答率

パネル検体	亜型	濃度* (copies/ $\mu$ L)	RNA抽出	正答率**
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。

\*\*正答率については、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12)

## 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
H1N1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。

2

2

(添付資料12)

### 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。

3

3



(添付資料13)

<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. POR法での結果、A/H1 pdm	conv. POR法での結果、A/H7	conv. POR法での結果、A/H3	conv. POR法での結果、A/H5	conv. POR法での結果、陰性	conv. POR法での結果、A/H5

<総合判定結果へのコメント>

全てのハネル検体について、正しく判定できていました。

<報告して下さったハネル検体の結果>

ハネルの型型	RNA抽出必要なハネル						抽出不要ハネル
	検体A H1N1pdm09	検体B H7N7	検体C H3N2	検体D H5N2	検体E H5N1	検体F H5N1	
データ1 Type A 型型	80 31.1 32.2	80 32.1 32.7	8 35.5 38.0	200 30.5 31.9	80 32.5 32.7	80 32.5 32.7	
データ2 Type A 型型	0.0 0.0	0.0 32.4	0.0 35.0	0.0 30.9	0.0 31.8	0.0 31.8	

\* 各検体の濃度は、500 μLの水で希釈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。

<ハ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高く出ているため、再検査を実施していますが、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、反希釈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。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、検査の検出感度は相対できると考えられます。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老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。

