

specimens (MePIC) ソフト (Takeuchi, F., et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67:62) によりヒト遺伝子配列を除いて megablast 解析を行った。MePIC により分類された塩基配列は MEtaGenome Analyzer (MEGAN) 4 (Universität Tübingen) により閲覧を行い、NoV の配列を抽出した。CLC Genomics Workbench (ver.6) を用いて、抽出した NoV のリードをアセンブリして Contig を作成し、再度 BLAST 検索を行った。得られた基準配列を元に Norovirus Genotyping Tool により NoV 遺伝子型 (ORF2) の推定を行った。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. 患者からの NoV、SaV 検出状況

ウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は19事例あり、うち食中毒事例は2事例であった(表1)。事例数としては2014年の13事例、2013年の14事例と比較してやや多かった。19事例中18事例からNoVが、1事例からSaVが検出された。

小児散発例として検査を実施した29例中13例からNoVが、3例からSaVが検出された。(表2)

### 2. 患者、下水流入水から検出された NoV 及び SaV の遺伝子型

集団発生の患者から検出されたウイルスはNoV GII.17、GII.4、GII.3の順に多

かった(表1)。散発例の患者ではNoV GII.4、NoV GII.3、SaV GI.1の順に多かった。(表2)、下水流入水から多種のNoV GI 遺伝子型が検出されたほか、NoV GII については、GII.17、GII.4、GII.3が検出され、集団発生と同様の傾向を示した。(表3)。

### 3. 検出された NoV 及び SaV の比較

検出されたNoV及びSaVの塩基配列を用いた系統樹を図1~4に示す。下水からは多種の遺伝子型GIが検出された。GI.3は6月から8月にかけて検出された株が互いに近縁であった(相同性99.0~100%)。集団発生事例と下水から検出されたGI.2のうち、1月の下水と3月の集団発生事例から検出された株は近縁であった(相同性99.7%)。NoV GIIは、集団発生事例と下水からはGII.17、GII.4の順に高い頻度で検出され、患者と下水で近縁な株が検出された(図2、3)。GII.4は、患者と下水ともにSydney 2012 亜型(Sydney/NSW0514/2012/AUと近縁)が主であった(図3)。GII.17は患者由来と下水由来のいずれの株も、2014/15シーズンに国内で検出されたKawasaki308/2015/JP株と近縁であった(相同性は患者検体で99.0~100%、下水検体で混合配列の多い検体を除き98.7~100%)。SaVについては、GII.1のみ患者と下水から共通に検出された。

### 4. 胃腸炎集団発生事例の NGS による解析

各検体のメタゲノム解析により検出されたNoV配列の遺伝子型とその他の胃腸炎ウイルスの内訳を表5に示す。リアルタイムPCR法でノロウイルス陰性であっ

た検体を含む全ての検体より、ノロウイルスのリードが検出された。また、SaVのリードが2検体より検出された。

事例1において、ダイレクトシーケンスで GII.4 (No.1) あるいは、GII.12 が検出された従業員 (No.2) からは、NGSでもそれぞれダイレクトシーケンスと同じ遺伝子型のみのリードが検出された。ダイレクトシーケンスで GII.4 が検出された患者2名 (No.3、4) のうち1名から GII.4 のリードが検出され、2名から GII.12 のリードが検出された。また、リアルタイム PCR で NoV 陰性であった3名 (No.5、6、7) からは GII.12 のリードが検出された。

事例2において、患者3名 (No.8、9、10) はそれぞれダイレクトシーケンスと同じ遺伝子型のリードが検出されたが、No.8はそのほかにNo.9、10と同じ GII.4 のリードも検出された。従業員から NoV のリードが検出されたものの、患者検出リードとは遺伝子型が異なっていた。

カキ関連事例である事例3、4、5のいずれの検体も、メタゲノム解析では、ダイレクトシーケンスで検出された遺伝子型だけではなく、多種の遺伝子型が検出された。事例5では、リアルタイム PCR で NoV 陰性であった2検体 (No.19、20) から NoV のリードが検出され、2検体 (No.14、15) からは SaV のリードも検出された。一方、ダイレクトシーケンスで SaV GI.2 が検出されていた No.20 からは SaV のリードが検出されなかった。ダイレクトシーケンスで混合波形を示し、遺伝子型が判定できなかった検体 (No.15) から、複数の遺伝子型が検出さ

れた。食中毒症状との関連は不明であるが、アイチウイルス (AiV) が7検体から検出された。

#### D. 考察

NoV GII.4 が小児散発例、集団事例、下水から年間を通じて検出されており、2014年までと同様にこの型が流行していたと考えられた。GII.4の亜型は2014年に引き続き Sydney2012 亜型が中心であったと考えられた。NoV GII.17 は特に3月から5月に集団発生事例から最も多く検出され、この期間に県内で流行していたと考えられた。下水からは患者のみられなかった7月から12月まで検出されたことから、この期間にも地域に感染者が継続して存在していたと考えられた。検出株はいずれも Kawasaki308/2015/JP に近縁であり、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンともにこのタイプが県内における流行の中心であると推定された。

NoV GI については、集団発生事例から検出された遺伝子型は2事例とも GI.2 であったのに対し、下水からはそれ以外の複数の遺伝子型も検出されたことから、GI は不顕性感染が多く、その中で GI.2 は集団発生を引き起こしやすいと考えられた。下水からは2013年の主要遺伝子型であった GI.4 や、2014年の主要遺伝子型であった GI.6 は減少し、GI.3 が最も多く5月から8月にかけて検出された。この型の検出配列は互いに近縁であったことから、同一のウイルスが地域で流行していたと考えられた。

患者と下水から検出された NoV には互いに近縁な株が存在していたことから、

下水には患者の発生状況が反映されていると推定された。

SaV については、2014 年 11 月から 12 月にかけて散発例から検出された GII.1 が 2015 年 1 月にも散発例と下水から検出されており、2014 年末からの GII.1 の流行が継続していたと考えられた。

ノロウイルスの検出された胃腸炎事例の患者及び従業員の検体について、NGS によるメタゲノム解析を行い、感染原因や感染経路の推定を行った。

事例 1 では、従業員 2 名からそれぞれ異なる遺伝子型が 1 種類のみ検出され、患者からはその一方もしくは両方の遺伝子型が検出されたことから、2 名の従業員がともに感染源となっていたと推測された。

事例 2 では、患者から共通の遺伝子型が検出されたのに加えて、2 名からはそれぞれ異なる遺伝子型も検出された。また、従業員からは患者と共通する遺伝子型は検出されなかった。このことから、従業員が感染源の可能性は低く、複数の遺伝子型を含む単一の感染源もしくは異なる感染源が存在していた可能性が考えられた。

生ガキを喫食していた事例(事例 3、4、5) から検出された 9 検体はいずれもメタゲノム解析で複数の NoV 遺伝子型が検出され、うち 2 検体からは SaV、7 検体からは AiV も検出されたことから、患者はカキに存在した複数種のウイルスに暴露していた可能性が考えられた。

メタゲノム解析で検出される配列には、NoV の遺伝子型別判定が可能な配列が含まれるとは限らず、型別判定の困難な場

合があった。そのため、PCR 法により再確認したり、PCR 産物を NGS で解析する方法なども考慮する必要があると考えられた。

## E. 結論

2015 年のノロウイルスは、例年流行している GII.4 のほか、集団発生を中心に GII.17 の流行がみられた。GII.4 の亜型は Sydney 2012 が主流であった。NoV GI は不顕性感染が多い傾向を示した。

NGS を用いたメタゲノム解析では、ダイレクトシーケンスで複数の遺伝子型が検出された事例では感染源の推測に有用であった。カキ喫食事例では、複数の NoV 遺伝子型や SaV、AiV の遺伝子が検出され、カキに含まれた複数種のウイルスの暴露を反映していると考えられた。メタゲノム解析ではウイルスの型別を行えない場合があり、他の方法で遺伝子型を再確認する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Noriko Inasaki, Mayumi Nagoya, Masae Itamochi, Ichiyo Shima, Masatugu Obuchi, Ryo Inahata, Sumiyo Hasegawa, Makoto Kuroda, Tetsutaro Sata, Takenori Takizawa: Detection of sapovirus GV.2 by the next generation sequencer in the stool specimens of patients of gastroenteritis outbreak from which pathogen had not been identified. FEMS 2015 (第 6 回欧州

微生物学会議), マーストリヒト, 平成 27 年 6 月 9 日

- 2) 名古屋真弓、稲崎倫子、嶋一世、板持雅恵、稲畑良、小渕正次、野田衛、佐多徹太郎、滝澤剛則: 胃腸炎集団発生事例のメタゲノム解析によるノロウイルスの検索. 第 63 回日本ウイルス

学会学術集会, 福岡市, 平成 27 年 11 月 22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 1. 集団発生事例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2015年												計	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
NoV	GI.2			1		1									2
	GII.3	2											1		3
	GII.4		2	2						1					5
	GII.6	1													1
	GII.17			3*	1	2									6
	GII.4+GII.17					1									1
SaV	GI.1											1		1	
合計														19	

(数値：事例数、\*：うち2事例は食中毒事例)

表 2. 小児散発例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2015年												計	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
NoV	GII.3	1		1											2
	GII.4	1					1						5		7
	GII.17					1									1
	GII型不明			1									2		3
SaV	GI.1					1						1			2
	GII.1	1													1
合計														16	

(数値：検体数)

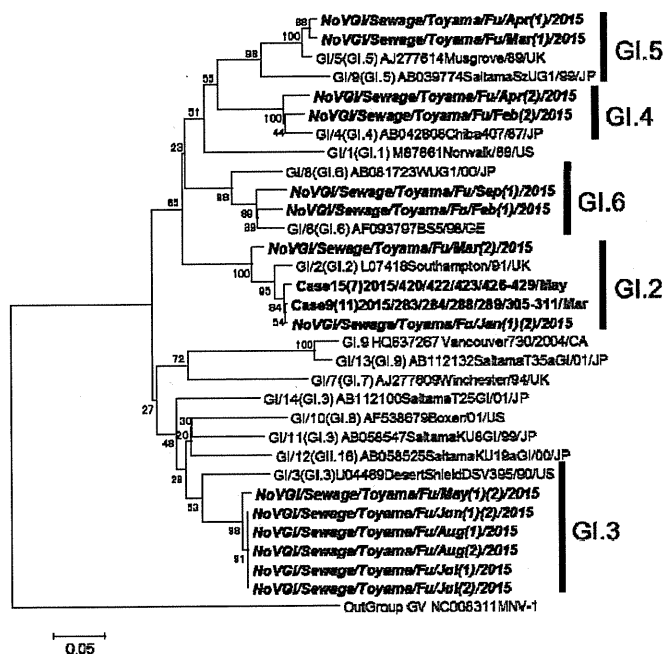
GII 型不明のうち、3月、12月の各1検体はリアルタイム PCR 陽性であったものの、PCR 陰性であった。12月の1検体は、シーケンスにより単一の塩基配列が検出されなかった。

表 3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2015年												計	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
NoV	GI.2														2
	GI.3													4	
	GI.4													2	
	GI.5													2	
	GI.6													2	
	GII.3													2	
	GII.4													4	
	GII.17													6	
SaV	GI.2													2	
	GII.1													1	

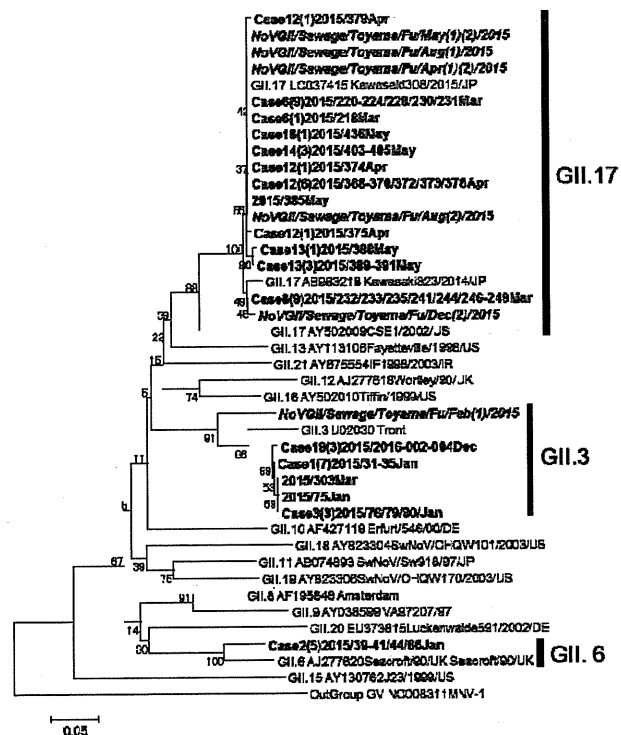
ウイルスが検出された月を灰色で示した。

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



系統樹は近接接合法で作成した。太字のうち斜体は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

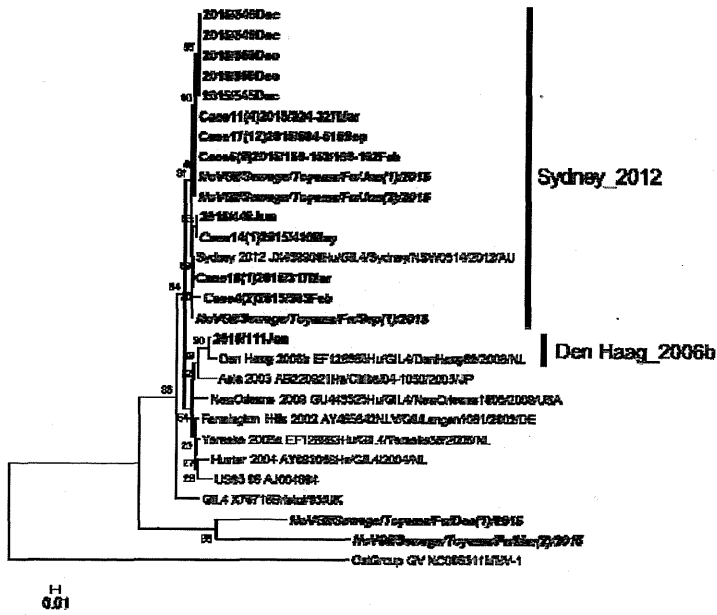
図 2. ノロウイルス GII の系統樹（GII.4 除く）



系統樹作成方法、株名については図 1 と同じ。下水から検出されたウイルスのうち、混

合配列が多いものは系統樹から除いた。

図 3. ノロウイルス GII.4 の系統樹



系統樹作成方法、株名については図 1 と同じ。GII.4 参考株については (亜型 accession no./株名) で示す。

図 3. サポウイルスの系統樹



系統樹作成方法、株名については図 1 と同じ。下水から検出されたウイルスのうち、混

合配列が多いものは系統樹から除いた。

表 4. メタゲノム解析を行った胃腸炎集団事例の概要

事例番号	発生時期	発生場所	推定感染源	検査数	ウイルス検出 検体数	ダイレクトシーケンス 検出ウイルス	本研究での 解析検体数
1	2012年2月	飲食店	食品	25(患者14、従業員11)	13(患者11、従業員2)	NoV GII.4 12名(患者11、 従業員1) NoV GII.12 1名(従業員)	7
2	2013年1月	飲食店	不明	4(従業員1、患者3)	4(従業員1、患者3)	NoV GII.17 1名 NoV GII.4 1名 NoV GII.4+GI.6 1名 NoV GII(リアルタイムPCR のみ陽性) 1名(従業員)	4
3	2010年4月	飲食店	食品(生岩ガキ喫食)	1(患者1)	1(患者1)	NoV GI.7 1名	1
4	2010年5月	飲食店	食品(生岩ガキ喫食)	11(患者8、従業員3)	7(患者7)	NoV GII.2 4名 NoV GI.4 2名 NoV GI.6 1名	1
5	2011年2月	飲食店	食品(生ガキ喫食)	10(患者7、従業員3)	6(患者6)	NoV GI.3 1名 NoV GII.14 3名 NoV GII型不明 1名 SaV GI.2 1名	7

表 5. メタゲノム解析により検出された胃腸炎ウイルス遺伝子の内訳

事例番号	検体番号	患者・ 従業員	NoV型別		その他の胃腸炎ウイルス メタゲノム解析 (リード数の多い順)	用いたMiSeq Reagent Kit
			ダイレクト シーケンス	メタゲノム解析 (リード数の多い順)		
1	1	従業員 (無症状)	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	2	従業員 (無症状)	GII.12	GII.12	-	Micro v2 (300 cycles)
	3	患者	GII.4	GII.4,GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	4	患者	GII.4	GII.12 他	AiV	v3 (150 cycles)
	5	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	6	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	7	患者	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
2	8	患者	GII.17	GII.17,GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	9	患者	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	10	患者	GI.6,GII.4	GII.4,GI.6	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	11	従業員 (無症状)	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
3	患者	GI.7	GI.7,GI.3,GI.9 他	-	v2 (500 cycles)	
4	患者	GII.2	GII.2,GI.3	-	v2 (500 cycles)	
5	14	患者	GII.14	GII.14,GII.7	AiV,SaV	Micro v2 (300 cycles)
	15	患者	GII型不明 (混合配列)	GII.14,GII.7,GII.6	SaV,AiV	Micro v2 (300 cycles)
	16	患者	GI.3	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	17	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	18	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	19	患者	ND	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	20	患者	ND (SaV GI.2検出)	GII.12,GII.1	AiV	v3 (150 cycles)

ND：検体 No. 11 はリアルタイム PCR で GII 陽性、PCR 陰性。その他はリアルタイム PCR で検出されず。

AiV：アイチウイルス



平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告

## ウイルスの食品検査の精度管理

研究分担者	鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター
研究協力者	中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
	梅津 麻実	一般財団法人食品薬品安全センター
	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	菅原 直子	宮城県保健環境センター
	木村 俊介	宮城県保健環境センター
	広川 智香	新潟県保健環境科学研究所
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	溝田 文美	愛媛県衛生環境研究所
	吉岡 健太	熊本県保健環境研究所

### 研究要旨

国内で食品のノロウイルス検査を実施している 11 機関を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理調査を行った。検体 7 種〔高濃度検体：3 種、低濃度検体：3 種（3 種はいずれも同一濃度）および陰性検体：1 種〕、および標準 cDNA 溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。なお、繰り返し測定回数は 2 回とした。また、検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用 cDNA 溶液も共通とした。その結果、各検査機関で調製した陰性コントロールではいずれの検査機関も陰性と判定したが、陰性検体（検体-4）において、1 機関が低濃度ながらも検出した。これに対して、陽性の 6 検体についてはいずれの検査機関も検出した。なお、同一濃度である高濃度検体の 3 種間および低濃度検体の 3 種間における報告値の平均値に有意差は認められなか

った。このとき報告された実測値の実数解析における変動係数は標準 cDNA 溶液においては 6%であったが、高濃度および低濃度検体ではいずれも 50~70%であった。一方、対数解析による高濃度検体の実測値において変動係数が 12~15%へと低下したが、低濃度検体においてはほとんど変化が認められなかった。これに対して、対数解析による高濃度検体、低濃度検体の換算値ではいずれも変動係数が 5~9%に低下した。

変動係数が大きいことにより許容範囲が広がるため、個別評価を行うことは難しくなると考えられるが、今回の換算値の対数解析において、z-スコアの許容範囲を管理限界線として設定することにより Xbar-R 管理図に基づく各検査機関の個別評価を行うことが可能となるものと考えられた。

## A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することになることから、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、一定の基準で結果を判断するためには、どの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成 9 年度より GLP 制度が導入された。また、国際的な試験所認定でもある ISO/IEC17025 では定期的な技能試験への参加が求められている。現在、一般的な微生物検査については国内においても技能試験が実施されているが、ノロウイルス検査については国内では導入されていない。また、これまでの検討結果からノロウイルス検査は比較的検査機関間のばらつきが大きいことから、ばらつきの軽減ならびに今後の外部精度管理調査の実施においてその評価方法を含めて決定することが必要となる。そのため、本研究では、共通検体を用いた外部精度管理調査を行うことにより、検査

精度を把握すること、ならびに得られた結果をもとに各検査機関の評価方法を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 調査検体

調査検体は糞便乳剤 7 種、標準 cDNA 溶液の合計 8 種とした。糞便乳剤の検体-1、3、6 を高濃度検体、検体-2、5、7 を低濃度検体、検体-4 を陰性検体とし、高濃度検体および低濃度検体の事前測定結果は以下のとおりであった。検体-1、3、6 :  $468.98 \pm 265.36$  コピー、検体-2、5、7 :  $5.81 \pm 1.73$  コピー (いずれも実測値)。なお、調査検体の均一性確認試験は国立医薬品食品衛生研究所にて実施した。

### 2. 外部精度管理調査の実施

協力機関である 11 機関を対象として、2015 年 9 月 16 日に国立医薬品食品衛生研究所より調査検体の発送を行った。なお、検査方法については、あらかじめ指定した共通の検査方法 (QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応およびリアルタイム PCR の実施) とした (表 1 参照)。また、検量線作

成に使用する標準 cDNA 溶液は共通で調査検体と同時に配布した。各検査機関における繰り返し測定回数はそれぞれ 2 回とした。各検査機関より Ct 値、実測値および換算値を回収し、得られた結果について統計解析を行った。あわせて、採用した検査方法 (表 2、3) および検量線の情報についても回収した。なお、統計解析および Xbar-R 管理図の作成は JMP ver. 11 を、z-スコア管理図の作成には Microsoft Excel 2010 を使用した。各検体における平均値の群間比較は Tukey-Kramer の HSD 検定により行い、 $p < 0.05$  のとき有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 検量線の解析

各検査機関が作成した検量線について観察したところ、機関 M で高い Ct 値が得られていたが、これ以外の検査機関では得られた Ct 値に大きな差異は認められなかった (図 1)。なお、作成した検量線における slope および Y-intercept も当方にて実施した回帰分析結果と近似していたことから、各検査機関における検量線の作成方法は同一であるものと考えられた (データには示していない)。

### 2. 調査検体における Ct 値の解析

標準 cDNA 溶液および陰性検体を除いた糞便薬剤 6 種の Ct 値に関する基本統計量を表 4 に示した。検量線における Ct 値と同様に機関 M がいずれの検体においても

最も高い値を示した (データには示していない)。また、全検査機関を対象とした変動係数を観察すると、3~7%であった。特に標準 cDNA 溶液では機関 M を除くと Ct 値の範囲は約 2 サイクルであり、非常に精度よく検査が実施されているものと考えられた。なお、高濃度検体の 3 本間および低濃度検体の 3 本間の Ct 値の平均値に有意差はいずれも認められなかった。また、各検査機関におけるリアルタイム PCR 装置は Life Technologies (9 機関) または Roche (2 機関) のいずれかであった。

### 3. 調査検体における実測値の解析

次に実数解析による実測値の解析を行った。基本統計量は表 5 に示した。標準 cDNA 溶液では実測値における変動係数が 6%であったのに対して、高濃度検体および低濃度検体では変動係数が 50~70%と標準 cDNA 溶液と比較すると大きかった。一方、対数解析による実測値の解析を行ったところ、標準 cDNA 溶液では変動係数が 0.4%に、高濃度検体では 12~15%に低下したが、低濃度検体では変動係数に大きな低下は認められなかった。なお、高濃度検体の 3 本間および低濃度検体の 3 本間の実測値の平均値に有意差はいずれも認められなかった。

また、陰性検体である検体-4 では、10 機関が陰性と報告したが、機関 D が低い濃度ながら定量値を報告した。しかし、この機関における要因を特定するには至らなかった。

### 4. 調査検体における換算値の解析

実数解析による換算値の解析を行った。基本統計量は表 6 に示した。標準 cDNA 溶

液では換算値における変動係数が 6%であったのに対して、高濃度検体および低濃度検体では変動係数が 50~70%と標準 cDNA 溶液と比較すると大きかった。一方、実測値と同様に対数解析を行ったところ、標準 cDNA 溶液では変動係数が 0.3%に、高濃度検体および低濃度検体では 5~9%に大きく低下した。なお、高濃度検体の 3 本間および低濃度検体の 3 本間の換算値の平均値に有意差はいずれも認められなかった。

#### 5. 外部精度管理調査の評価方法の検討

本研究の最終的な目的は、外部精度管理調査を実施すること、すなわち得られた結果に基づいて、各検査機関の評価を行うことである。そこで、今回得られた結果を用いて評価方法を検討することとした。なお、評価方法として一般的に技能試験において採用されている z-スコア管理図および繰り返し測定を実施していることを考慮して、測定値とばらつきの両者を評価するための Xbar-R 管理図を用いることとした。なお、Xbar-R 管理図では評価を行うために管理限界線を設定する必要があるが、一般的なシューハート管理図における管理限界線の設定方法では非常に許容範囲が狭いことに加え、現在の食品衛生外部精度管理調査で採用している添加回収率に基づく設定を行うことも難しいことから、z-スコア等を用いた新たな管理限界線を設定することとした。なお、R 管理図における管理限界線は JIS に記載の係数表を用いて算出した値とした。

はじめに実測値および換算値の z-スコアについて算出した (図 7~10)。その結

果、実数解析では標準偏差が大きいこともあり、実測値および換算値の両方で検体-2を除いて z-スコアの絶対値が 2 以上となった検査機関はなかった。これに対して、対数解析では実測値および換算値の検体-1、3、5、6 および 7 において；z-スコアの絶対値が 2 以上の検査機関が 1 機関認められた。

以上のことから、z-スコアを用いることにより評価を行うことが可能と考えられたため、Xbar 管理図における管理限界線を  $|z\text{-スコア}|=2$  と設定したときの Xbar-R 管理図を作成し、繰り返し測定時のばらつきを加味して評価することが可能か検討した。z-スコアによる解析結果から、実数解析では正しい評価を行うことが難しいと考えられたことから、Xbar-R 管理図による評価は対数解析を対象とした。さらに、実測値では低濃度検体において変動係数が大きく、評価を行うことが難しいと判断したため、換算値を解析対象として採用した (図 11~14)。その結果、機関 D が検体-1、3、5、6、7 で Xbar 管理図において管理限界線を下回った。また R 管理図では機関 F が検体-1、3、6 において管理限界線を上回った。

#### D. 考察

これまでの検討から、ノロウイルス検査では各検査機関における検査結果に比較的ばらつきが大きかったことを踏まえ、本年度はばらつきが小さくなることを想定した試験デザインとした。すなわち、検査方法の指定、検量線作成用標準 cDNA 溶液の共通化および検査担当者の限定である。これにより、昨年度までの結果と

異なり、標準 cDNA 溶液および検体のいずれにおいても変動係数が劇的に小さくなった。特に標準 cDNA 溶液における Ct 値は、機関 M を除くと 2 サイクル程度の範囲内にあることから、各検査機関において精度良く検査が実施されているものと考えられた。機関 M については全ての検体で Ct 値が最も高かったことから、検査に使用する酵素量等が少なかったことにより、PCR 反応に抑制的影響をもたらした、あるいは機器の問題の可能性も考えられた。しかし、各検査機関で使用しているリアルタイム PCR 装置は Life Technologies または Roche のいずれかであったが、Roche のリアルタイム PCR 装置は Life Technologies のリアルタイム PCR 装置とは異なる方法で Ct 値を求めているため、単純に Ct 値を比較して評価を行えるのかについては再度検証の必要性があると考えられる。しかし、機関 M は Life Technologies のリアルタイプ PCR 装置を採用していることから、その他の同一機器を採用している検査機関との比較は可能と思われる。また、高濃度検体の 3 種および低濃度検体の 3 種はそれぞれ濃度が同一であったが、これら 3 本の平均値に有意差が認められなかったことから、各検査機関で正しく検査が遂行されているものと考えられた。今回の糞便乳剤検体における変動係数は実数解析の場合には 50~70%であったことから、このまま各検査機関の評価を行うことは難しいと考えられた。すなわち、この状態では z-スコアを用いた解析を実施しても許容範囲が非常に広がるために、見かけ上外れ値がないように見えるということである。

しかし、対数解析を実施することにより、特に換算値での解析においても変動係数が 10%を下回った。これは実測値の標準偏差と換算値の標準偏差が同じであったため、それぞれの平均値が実測値での 1200 倍という係数により底上げがあったことによるものであると考えられた。そのため、外部精度管理調査の最終的な目的である各検査機関の技能評価を行ううえでも非常に有効な結果であると示唆された。そこで、z-スコアによる解析を行ったところ、外れ値の検出が可能であった。また、2 回の繰り返し測定を行っていることを考慮すると、ばらつきの評価を行ったほうがより良いものと考えられることから、Xbar-R 管理図による解析を試みた。しかし、R 管理図における管理限界線は JIS の係数表から求めることで問題ないが、Xbar 管理図における管理限界線については JIS の係数表から求めても非常に狭い範囲が許容範囲として設定されるので、検査結果を当てはめるには適していない。また、理化学検査のように添加回収率を管理限界線として設定することもできない。そのため、z-スコア管理図における  $|z\text{-スコア}|=2$  の値を管理限界線として設定した。すなわち、z-スコアによる管理を Xbar 管理図に組み入れることにより評価を行うこととした。その結果、z-スコアの各検査機関間の変動と 2 回繰り返し測定時の範囲の両者を観察することが可能となった。しかし、これまでの外部精度管理調査結果から考えると、今回の結果が限定的に得られた可能性も否定できないことから、評価方法については今後もデータの蓄積を行い決定したほ

うが良いものと考えられた。

#### E. 結論

国内でノロウイルス検査を実施している検査機関（11 機関）を対象に外部精度管理調査を行った。今回、検査方法、検量線作成用標準 cDNA 溶液および検査担当者をあらかじめ指定することにより、検査精度の改善が認められた。また、得られた報告値について実数解析および対数解析を実施したところ、変動係数から判断して対数解析のほうがより適切であると考えられた。そのため、対数解析で得られた基本統計量をもとに各検査機関の評価を行うため、 $z$ -スコアおよび  $\bar{X}$ - $R$  管理図を採用したところ、 $\bar{X}$  管理図の管理限界線を  $|z\text{-スコア}|=2$  の値とすることで評価ができることが示唆された。

しかし、今回の結果が限定的なものである可能性も否定できないことから、評価方法の決定には基本統計量の継続的な推移を観察することが必要であると考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 指定した検査方法の詳細

検査方法		初期設定	
RNA抽出	RNA抽出キット	QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, 52904)	
DNase処理	DNase	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A)	
	Buffer	5× First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	
	装置		
逆転写反応	逆転写酵素	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):	
	反応バッファー	反应用バッファー(5× SSII Buffer ) および 100mM DTT	
	RNaseインヒビター	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	
	cdNTPs mix	10mM dNTPs mix ( life technologies, 18427-013)	
	プライマー	ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	
	装置		
リアルタイムPCR	マスターミックス	Taq Man Universal Master Mix	
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	
		ALPF	
		COG2R	
	プローブ(合成受託会社)	RING2AL-TP	
リアルタイムPCR装置	7500(life technologies)		

表2 ノロウイルス検査における各検査機関での採用手法の詳細(1/2)

検査方法		機関A	機関B	機関C	機関D	機関F	機関G	
RNA抽出	RNA抽出キット							
DNase処理	DNase			Dnase I Amplification grade (Invitrogen 18068015)				
	Buffer							
	装置	ABI2720	Gene Atlas(ASTEC)	Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー	Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700	Veriti (Applied Biosystems)	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (タカラバイオ)	
逆転写反応	逆転写酵素							
	反応バッファー							
	RNaseインヒビター			RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen 10777019)				
	cdNTPs mix	dNTPs mix (Roche#11814362001)				10mM dNTPs mix (タカラ, 4630)		
	プライマー	ランダムプライマー (Roche#11034731001)			Random Hexamers (Roche, 58002113-01)	ランダムプライマー (Roche, 11034731001)		
	装置	ABI2720	Gene Atlas(ASTEC)	Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー	Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700	Veriti (Applied Biosystems)	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (タカラバイオ)	
リアルタイムPCR	マスターミックス							
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	SIGMA Genosys	Invitrogen	Invitrogen	Fasmac	(SIGMA)	ファスマック
		ALPF	フナコシ	Invitrogen	Invitrogen	Fasmac	(SIGMA)	ファスマック
	プローブ(合成受託会社)	COG2R	SIGMA Genosys	Invitrogen	Invitrogen	Fasmac	(Applied Biosystems)	ファスマック
		RING2AL-TP	eurofins	TaKaRa	Invitrogen	Applied Biosystems TaqMan(R) プローブ	(Applied Biosystems)	life technologies
リアルタイムPCR装置	7500(life technologies)	LC480(Roche)	7500(life technologies)	7500(life technologies)	7500 (Applied Biosystems)	7500 Fast(life technologies)		

変更のあった試薬等  
 空欄: 初期設定から変更なし



表3 ノロウイルス検査における各検査機関での採用手法の詳細(2/2)

検査方法		機関H	機関I	機関K	機関L	機関M	
RNA抽出	RNA抽出キット						
DNase処理	DNase	Deoxyribonuclease(RT Grade)(ニッポンジーン, No.313-03161)					
	Buffer					10×DNase I Buffer	
	装置	BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Mastercycler gradient (eppendorf)	2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)	ABI 2720 (life technologies)	ASTEC PC815	
逆転写反応	逆転写酵素						
	反応バッファー						
	RNaseインヒビター						
	cdNTPs mix	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England BioLabs, N0447S)			Expand High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche, 04738276001) に添付		
	プライマー		Random 6mers (タカラ, RR037A)				
装置	BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Mastercycler gradient (eppendorf)	2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)	ABI 2720 (life technologies)	ASTEC PC815		
リアルタイムPCR	マスターミックス	LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics)					
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	SIGMA genosys	life technologies japan	Applied Biosystems	Life Technologies	日本遺伝子研究所
		ALPF	日本遺伝子研究所	life technologies japan	Applied Biosystems	Life Technologies	日本遺伝子研究所
	プローブ(合成受託会社)	COG2R	SIGMA genosys	life technologies japan	Applied Biosystems	Life Technologies	日本遺伝子研究所
		RING2AL-TP	Thermo Scientific	life technologies japan	Applied Biosystems	Life Technologies	日本遺伝子研究所
リアルタイムPCR装置		LightCycler480 (Roche Diagnostics)	7500(life technologies)	7500(life technologies)	7900HT (life technologies)	7500(life technologies)	

変更のあった試薬等

空欄: 初期設定から変更なし

表4 ノロウイルス検査における外部精度管理調査結果 (Ct 値)

		平均±標準偏差	変動係数 (%)
標準 cDNA 溶液		21.1748±1.4544	6.8686
高濃度検体	検体-1	31.8299±1.6306	5.1229
	検体-3	31.9417±1.7299	5.4157
	検体-6	31.9999±1.7128	5.3524
低濃度検体	検体-2	38.7924±1.3292	3.4265
	検体-5	38.9238±1.4082	3.6177
	検体-7	39.0974±1.6058	4.1073

表5 ノロウイルス検査における外部精度管理調査結果 (実測値)

		実数解析		対数解析	
		平均±標準偏差	変動係数 (%)	平均±標準偏差	変動係数 (%)
標準 cDNA 溶液		$4.7423 \times 10^5 \pm 2.7213 \times 10^4$	5.7384	5.6752±0.0252	0.4434
高濃度検体	検体-1	$4.9660 \times 10^2 \pm 2.4431 \times 10^2$	49.1978	2.6191±0.3055	11.6655
	検体-3	$4.8593 \times 10^2 \pm 2.4936 \times 10^2$	51.3165	2.5883±0.3580	13.8315
	検体-6	$4.7621 \times 10^2 \pm 2.4660 \times 10^2$	51.7850	2.5709±0.3800	14.7827
低濃度検体	検体-2	$5.6330 \times 10^0 \pm 3.8078 \times 10^0$	67.5979	0.6344±0.2990	47.1340
	検体-5	$4.8099 \times 10^0 \pm 2.8586 \times 10^0$	59.4308	0.5886±0.2897	49.2231
	検体-7	$4.6175 \times 10^0 \pm 2.7314 \times 10^0$	59.1535	0.5572±0.3237	58.1017

表6 ノロウイルス検査における外部精度管理調査結果（換算値）

		実数解析		対数解析	
		平均±標準偏差	変動係数 (%)	平均±標準偏差	変動係数 (%)
標準 cDNA 溶液		$5.6908 \times 10^8 \pm 3.2656 \times 10^7$	5.7384	$8.7544 \pm 0.0252$	0.2875
高濃度検体	検体-1	$5.9592 \times 10^5 \pm 2.9318 \times 10^5$	49.1978	$5.6983 \pm 0.3055$	5.3618
	検体-3	$5.8311 \times 10^5 \pm 2.9923 \times 10^5$	51.3165	$5.6675 \pm 0.3580$	6.3167
	検体-6	$5.7145 \times 10^5 \pm 2.9593 \times 10^5$	51.7850	$5.6501 \pm 0.3800$	6.7264
低濃度検体	検体-2	$6.7595 \times 10^3 \pm 4.5693 \times 10^3$	67.5980	$3.7136 \pm 0.2990$	8.0522
	検体-5	$5.7719 \times 10^3 \pm 3.4303 \times 10^3$	59.4307	$3.6678 \pm 0.2897$	7.8993
	検体-7	$5.5410 \times 10^3 \pm 3.2777 \times 10^3$	59.1536	$3.6364 \pm 0.3237$	8.9026

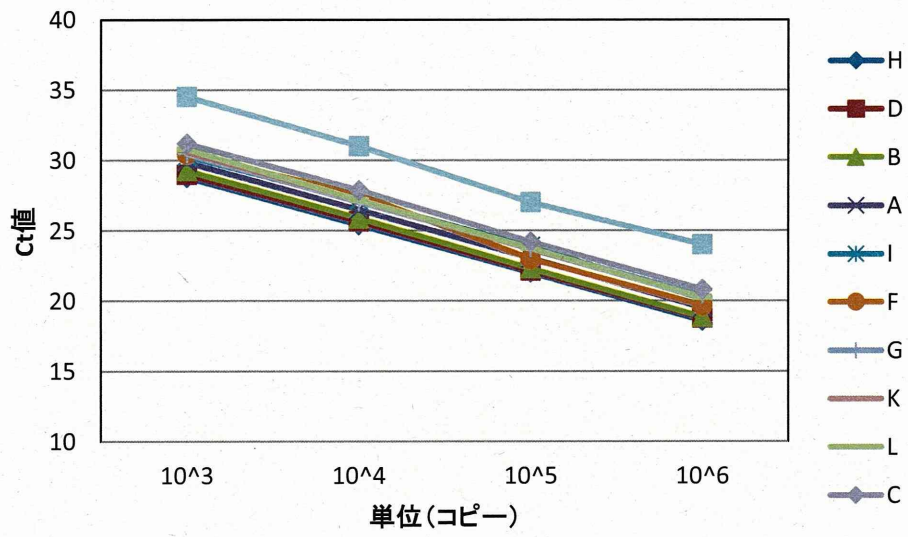


図1 ノロウイルス検査における各検査機関の検量線