

## H27年度のシーケンス・系統樹解析精度管理調査

### 1) 材料・方法:

・NoVPCR産物(300bps程度)

1) 材料の塩基配列解析(シーケンス解析)

2) 近隣結合法(NJ法)による系統樹解析

精度管理調査内容:

1) 塩基配列解析の精密度

2) 塩基配列解析長

3) 解析試料の系統樹上の位置

4) 標準株との塩基配列相同性

2. 相同性検索

・適切な塩基配列株を選択: 47/62施設 (76%)

・適切なアミノ酸配列株を選択: 43/62施設(69%)

3. 適切な系統樹解析: 59/62施設 (95%)

4. 適切なgenotyping(GII.4): 62/62施設(100%)

### 2) 参加機関: 62機関

### 3) 解析結果

1. シーケンス解析

・適切なシーケンス解析: 47/62施設(76%)

・ミスリード: 5施設 (1~8塩基)

・含プライマー配列: 14施設

・320bp以下: 4施設

・Reverse配列送付: 1施設→再提出:30bp短, 含プライマー配列

### 4) シーケンス解析ミスと対処法

1. 機器: シーケンサーの不良(レーザーの出力低下、光軸のズレなど)

→ 機器のメンテナンス

2. 試薬: 反応試薬・精製試薬の劣化

→ 陽性コントロールによる確認、使用期限確認、保存状態確認

3. 手技: 手技的不良による反応性の低下

→ 手技の統一・習熟、結果見直し、再検査

## 平成27年度コレラ菌の外部精度管理調査

### 調査目的

- ・ 三類感染症であるコレラの原因となるコレラ菌の同定  
(患者または無症状病原体保有者の決定は地衛研の検査による)  
(性状と血清型、毒素産生性、届出基準が正答できるか)
- ・ 生きた菌株を用いた精度管理体制構築(発送、輸送、温度管理等)、
- ・ 菌株の安定性の確認と課題解決(菌株選択)

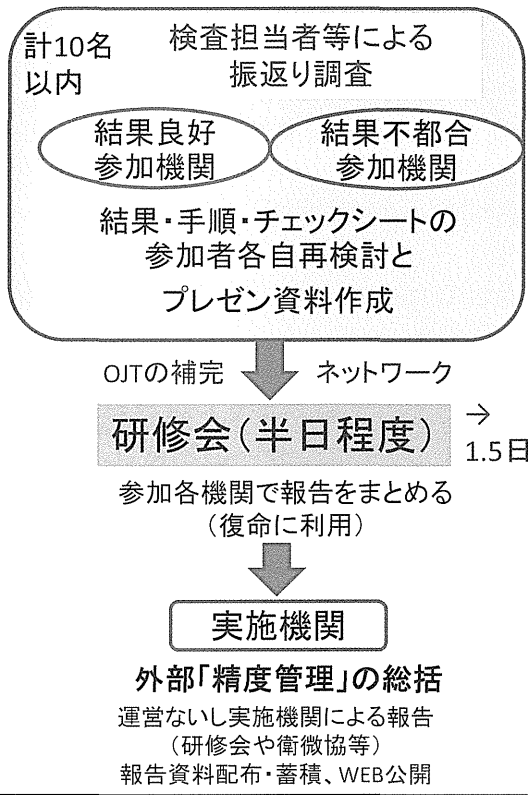
結果の要約	結果提出機関	74/74(100%)		
	送付試料の状態	良好72	一部不良2	
温度記録	データ提出	機器入忘れ	記録なし	
	53	1	20	
検査結果	試料1	試料2	試料3	
陽性回答	72	7	74	
陰性回答	2	66(1*回答根拠誤)		0

### 課題

菌株	<ul style="list-style-type: none"> <li>・生きた菌株での外部精度管理の課題が明らか</li> <li>・発送する菌株を決定するために時間を要する</li> <li>・Vibrio属である問題(表現形の変異)</li> </ul>
回答シート	回答欄の選択肢の一部不備。自由記載欄設定不足等

## 平成27年度 外部精度管理調査実施後研修(ウイルス検査)

➤ これまでの研修等は、座学 or 座学と実習



### 目的

昨年度の外部精度管理調査(ノロウイルスリアルタイムPCR法)をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげる。

### 実施内容(1グループ6名の少人数)

- ・OJTを模したグループミーティング形式でリアルタイムPCR法のトラブルシューティングを行う
- ・実習・講義や全体討論を通して問題への気づきや問題解決方法に対する理解を深める
- ・研修後、トラブルシューティング集と研修担当者のコメントを追加したワークシートを送付し、参加者は職場で研修が問題解決に役立ったか後日回答(フォローアップ調査)

### 参加機関

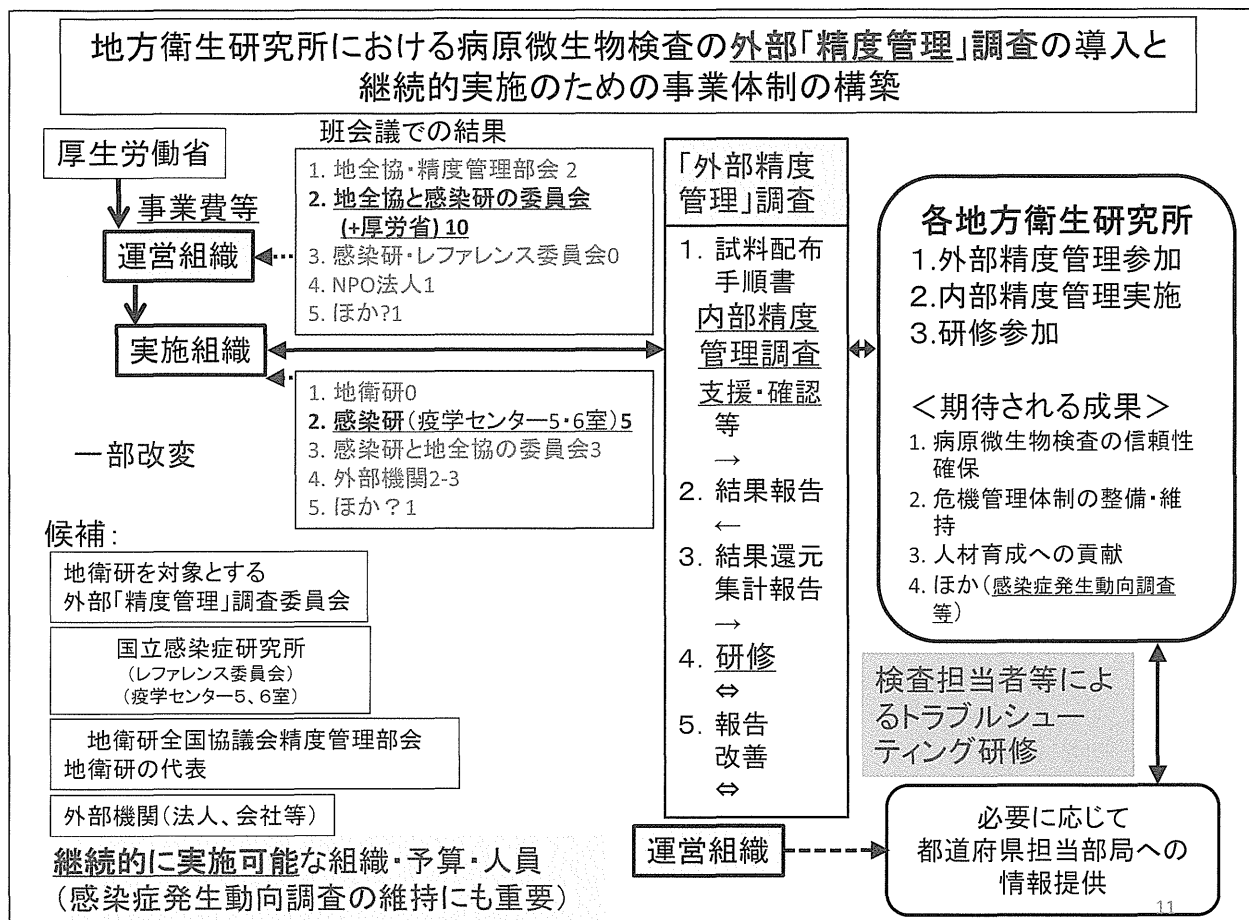
- 昨年度の外部精度管理参加機関から、下記の各群より選出した代表10機関
- A: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲外の機関(10機関) → 4機関
  - B: 1つの測定値のみがべき乗変換後1SD範囲外の機関(8機関) → 4機関
  - C: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲内の機関(38機関) → 2機関

9

## 今回のリアルタイムPCR法のトラブルシューティング集

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●陰性コントロールのウェルが陽性になる	◆標準物質のコンタミネーションによるピペッター、チューブ類の汚染 ◆標準物質のコンタミネーションによる試薬類の汚染	■ピペッター、チューブ類、試薬類の交換(汚染物質の除去) ■実験室レイアウトや動線の見直し(試薬調製と標準物質の添加を別室で行うなど汚染物質を持ち込まない) ■作業工程の見直し(反応液→検体サンプル→標準物質の順で調製) ■作業工程ごとに専用のピペッター、チューブ類を使用 ■同一安全キャビネット内で全操作を行う場合は十分なUV照射 ■オートクレーブの使い分け(試薬調製用と汚物用) ■標準物質や検体由来核酸の分取・分注時は安全キャビネットのファンを止める(エアロゾル発生防止)
●低濃度(10コピーや10 <sup>2</sup> コピーDNA)の標準物質が検出不能	◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解	■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の水冷
●標準曲線の傾きが急(各希釈のCt値の間隔が3.3以上)	◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解	■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の水冷
●標準物質のCt値が低め、あるいは高め(濃度が理論値とは異なる)	◆標準物質の劣化 ◆試薬類の管理が不適切(反応試薬、プライマー&プローブ) ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆濃度計算ミス	■標準物質、試薬類の管理の見直し(保管温度、使用期限、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈の各段階でチップを交換(キャリーオーバー防止) ■作業記録をつける(ダブルチェック)
●標準物質間(GIとGII)でCt値に差	◆プライマー・プローブの劣化 ◆プライマー・プローブプレミックスの劣化	■新たに合成したプライマー・プローブの使用 ■試薬の使用期限を順守
●標準物質の測定値がばらつく(相関係数R <sup>2</sup> が0.990以下)	◆不適切なピペット操作による試料添加量の誤差 ◆標準物質不適切な希釈操作 ◆測定機器の温度ブロックの汚染 ◆測定機器の不具合	■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈系列の調製時に液の撹拌とスピンドラウンを確実に実施(ピペッティングはしない) ■測定機器の温度ブロックの清掃 ■測定機器の定期点検の実施

10



平成26、27年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)  
 地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施の  
 ための事業体制の構築に関する研究  
 (H26-健危-一般-001)

## まとめと結論

1. 地方衛生研究所全国協議会が主体となって、感染症検査の外部「精度」管理のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案し提言を目的。
2. 地研の「精度管理」実態調査、および、リアルタイムPCR、シーケンス解析、サルモネラ属菌やコレラ菌の同定をテーマにした外部「精度」管理調査、リアルタイムPCRのトラブルシューティング研修等を、多くの地研や感染研の研究協力者を得て、企画・実施し、関連書類等を作成。
3. 感染症検査の外部「精度」管理は調査は質の保証に有意義で、さらに地研の人材育成にも役立てられる。
4. 外部「精度」管理・内部「精度」管理・研修を一体化して実施することが効果的。
5. 外部「精度」管理を継続的に実施するには、恒常的な運営組織や実施組織・予算・人員が必要不可欠で、案を提示。
6. 臨床検体からの病原体の分離同定をテーマとした調査等が必要。

## Ⅱ. 分担研究報告書

## 1. 精度管理に関する技術的支援

### —シーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査—

研究分担者	木村 博一、大石 和徳	国立感染症研究所
研究協力者	塚越 博之、小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター
	小渕 正次	富山県衛生研究所
	皆川 洋子	愛知県衛生研究所
	松島 勇紀、清水 英明	川崎市健康福祉局健康安全研究所
	勝見 正道	仙台市衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	藤井理津志、岸本 寿男	岡山県環境保健センター
	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	宮崎 義継、駒瀬 勝啓、影山 努、野田 雅博、長澤 耕男	国立感染症研究所

**研究要旨** 地方衛生研究所（地研）におけるウイルス検査の精度管理を試行的に行うため、ノロウイルス(NoV)の模擬検体を用いたシーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理を行った。模擬検体には、GII.4 の PCR 産物を用いた。また、各機関における測定機器、測定条件および試薬管理状況などに関する詳細なアンケート調査も行った。本研究においては、塩基配列リードミスの有無、解析長、プライマー配列の有無、塩基配列相同性解析結果、アミノ酸配列相同性解析結果、系統樹上の解析株の位置、系統樹解析法の精度、遺伝子型の精度、計 8 項目を各 1 点とし、合計 8 点で判定を行った。本研究参加機関 62 機関の平均は 7.0 点（最高 8 点、最低 3 点）であった。全項目とも適切（8 点）であった機関は 30 機関（48.3%）であった。今後、さらに本研究を進展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と技術支援を行う必要がある。

#### A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）は、各自治体における科学的・技術的中核機関として位置づけられている。したがって、健康危機管理にかかわる各法律（感染症法や食品衛生法など）に定める自治体行政検査に高い精度が求められることは言うまでもない。

近年、病原微生物の検出・同定検査には遺伝子学的手法が幅広く取り入れられている。その中でも、特にシーケンス解析および分子系統樹解析は、種々のウイルスの詳細な遺伝学的特性を把握するうえで極めて重要である。また、これらの解析データは、ノロウイルス、インフルエンザウイルスおよび麻疹ウイルスなど分子疫学解析として日常的に実施

されている。

いうまでもなく、これらの検査診断における外部精度管理は、各機関における検査精度の確保・向上のためだけでなく、地研全体での検査水準の確認および確保のためにも必要であると思われる。しかしながら、地研において、継続的かつ実務的な外部精度管理は、ほとんど行われていないのが実情であると思われる。このような背景から、地研におけるウイルス検査診断に関する外部精度管理の一環および地方衛生研究所全国協議会として外部精度管理を行う場合の課題を抽出する目的でノロウイルス遺伝子シーケンス解析および分子系統樹解析に関する外部精度管理を行った。

## B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会加盟機関（80 機関）を対象として、NoV ウイルスシークエンスおよび分子系統樹検査解析に関する精度管理を実施した。参加の形態は任意とし、本研究の参加案内は、地全協のメーリングリストを用いた。まず、精度管理を行うにあたり、当該研究班による外部精度管理実施要領と外部精度管理実施手順を作成した（別添資料 2 および 3）。また、測定時の詳細なデータ記入ファイル（別添資料 4）およびアンケート（別添資料 5）も作成した。

次に、模擬検体試料として、GIL4 の PCR 産物を作成した。同 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、単一のバンドを切り出し精製し、100 倍希釈したものを今回の解析用試料として配布した。また、系統樹作成用参照株のデータセットも併せて配布した。COG2F および G2-SKR をプライマーとして用い、試料を常法による PCR 増幅、シークエンスを施行し、その塩基配列、相同性解析結果、近隣結合法で作成した系統樹、模擬検体試料の遺伝子型をデータとして回収した。

得られたデータを以下の 8 項目（1-a: ミスリードの有無、1-b: 解析長、1-c: プライマー配列の有無、2-a: 塩基配列相同性解析結果、2-b: アミノ酸配列相同性解析結果、3-a: 系統樹上の解析株の位置、3-b: 系統樹解析法の制度、4: 解析株の遺伝子型の精度）を各 1 点、合計 8 点として判定を行った。さらに、各試薬の管理状況や機器定期点検の実情などに関する詳細なアンケート調査も実施した。

## C. 研究結果

参加希望機関は 62 機関であり、その全機関が本研究に参加した。参加機関の所属自治体の内訳は、都道府県 41 機関、政令指定都市 15 機関、中核市 6 機関であった。

送付データを解析した結果、解析全参加機関の平均点は 7.0 点であった。所属自治体毎では都道府県 7.2 点、政令指定都市 7.1 点、中核都市 5.8 点であった（図 1）。全項目適切（8 点）であった機関は 30 機関（都道府県: 23、政令指定都市: 7）であり、最低点は 3 点の 2 機関（都道府県: 1、政令指定都市: 1）であった。また、ブロック別の比較では、全 6 ブロック中平均 7 点以上のブロックが 4 ブロックある一方で、5 点台のブロックも認めた（最高 7.6 点、最低

5.6 点）。

シークエンス解析では、47 機関（75.8%）が適切に解読できていた一方で、リードミス 5 機関（8.1%）、解析・送付した塩基配列にプライマー配列を含んでいた機関が 14 機関（22.6%）、解析長が不十分と思われる機関が 4 機関（6.5%）あった（表 1）。

BLAST による相同性解析では、塩基配列解析においては 47 機関（75.8%）、アミノ酸配列においては 43 機関（69.4%）が適切であった。近隣結合法による系統樹作成は概ね適切であった（59/62 機関、95.2%）。試料株の遺伝子型（GIL4）は全機関とも適切であった。今回の解析において、試料株の遺伝子型の推定は、BLAST 検索単独、系統樹解析単独、あるいは BLAST+系統樹でも行える。BLAST 検索では、数十ベース程度のキャプシド遺伝子の塩基配列、たとえシークエンスデータに数塩基程度のリードミスが含まれていても遺伝子型の推定が可能であると思われる。よって、十分なシークエンスデータが得られなかった機関でも供試株の遺伝子型の推定が可能だったと思われる。

次に、本研究の参加機関 62 機関のうち、アンケートが回収できたのは 50 機関（80.6%）であった。まず、シークエンス解析機器は、45 機関（90.0%）が Applied Biosystems 社製であった（図 2）。シークエンス反応試薬は全機関がメーカー純正品を使用していた。また、約半数の機関は試薬使用期限内で使用していると思われたが、残りの機関は、使用期限外の試薬も使用していた（図 3-5）。さらに、シークエンサーのマニュアルを 29 機関が「理解している」と答えたのに対し、19 機関が「読んだ事はない」「理解していない」と解答した。

## D. 考察

本研究においては、NoV GIL4 株の PCR 産物を模擬検体として、シークエンス解析・分子系統樹解析（8 項目）に関する外部精度管理を実施した。その結果、8 項目とも適切に解析できたのは 30 機関（30/62 機関、48.3%）であった。

今回の精度管理に適用したノロウイルス遺伝子解析法は、地研において、既に確立されている方法であり<sup>1)</sup>、ほとんどすべての地研において、行政検査のみならず、ノロウイルス感染症の分子疫学に関する調査研究にも用いられていると思われる。BLAST 検索と適切な参照株を用いた系統樹解析による NoV

遺伝子型推定は感染源調査などにおいて重要であることはいうまでもない。よって、適切な技術を基盤とし、かつ一定期間の経験を有する技術者であれば、今回の解析項目においては適切なデータが得られると思われる。その一方で、今回得られたデータにおいては、本解析データの中核である塩基配列のミスリードが5機関(8.1%)に見られた。解析時に得られた各塩基配列の蛍光曲線から、この原因の一つとして、PCR産物の精製が不十分であった可能性が高いと思われた。また、BLASTによる塩基配列解析とアミノ酸解析に矛盾がみられた機関も12機関(19.4%)あった。加えて、シーケンスデータのトリミングが不十分で、プライマーの塩基配列もBLAST解析や系統樹解析データとして含めた機関も14機関(22.6%)あった。これらのことを解決するためには、各機関において、本法における基本的技術および知識に関するon the job training(OJT)をさらに徹底していく必要があると思われた。

また、本研究にかかわるアンケートは、参加機関62機関中50機関(80.6%)から回収できた。45施設(90.0%)が、特定のシーケンサー(Applied Biosystems社製)を使用していた(図2)。また、全機関で測定機器メーカーが販売している試薬を使用しており、機関ごとで使用している試薬には差は認めなかった。半数の機関が期限内の試薬を使用しているものの、半数では期限外の試薬でも測定結果のばらつきがなければ使用すると解答した(図3-5)。予算の関係上、期限切れの試薬でも使用せざるを得ないとのコメントが多く、各機関が限られた予算内での検査を求められている実情が明らかになった。一方で、19機関がシーケンスのマニュアルを「読んだことがない」「理解していない」と解答しており、やはり基礎知識に関するOJTの徹底が必要と思われた。アライメントおよび系統樹解析は38施設(76%)がMEGAを使用していた。シーケンスおよび系統樹解析を実行可能な職員が複数名いる施設は48施設(96%)であった(図6)。1年に1回程度、7-9月にノロウイルスリアルタイムPCRの精度管理を希望する施設が多く(図7)、精度管理の業務量は適切と解答した施設は47施設(94%)であった(図8)。1年に1回程度、ノロウイルス流行開始前の7-9月ごろであれば、日常業務への負担を抑えながら、外部精度管理を継続していくことができるのではないかと考えられた。

地研における微生物検査は、予算・定員などの検査資源が年々削減されており、職員の技術水準と検査精度の維持が困難となっていると思われる。また、熟練技術者の退職時の際の技術の伝承も十分に行われていない可能性がある。さらに、地研の重要度に関する地方自治体の認識にも差があり、地方分権推進により、各地研間の人的資源・技術力に大きな格差が生じている可能性もある。したがって、今後もこのような状況が続けば、検査精度を十分に担保した行政検査が各自治体で行うことが困難になる可能性がある。今後、このような状態を改善するための取り組みとともに、地研における微生物検査の外部精度管理を継続的に実施できるような体制整備が極めて重要であると思われる。

## F. 参考文献

1. ノロウイルスの検出法について、食安監発第1105001号。

## G. 研究発表

- 1) 論文発表  
関連論文はなし
- 2) 学会発表  
関連発表はなし

## H. 知的財産の出願・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

**謝辞** 本研究にご協力いただきました各衛生研究所に深謝します。

(機関数)

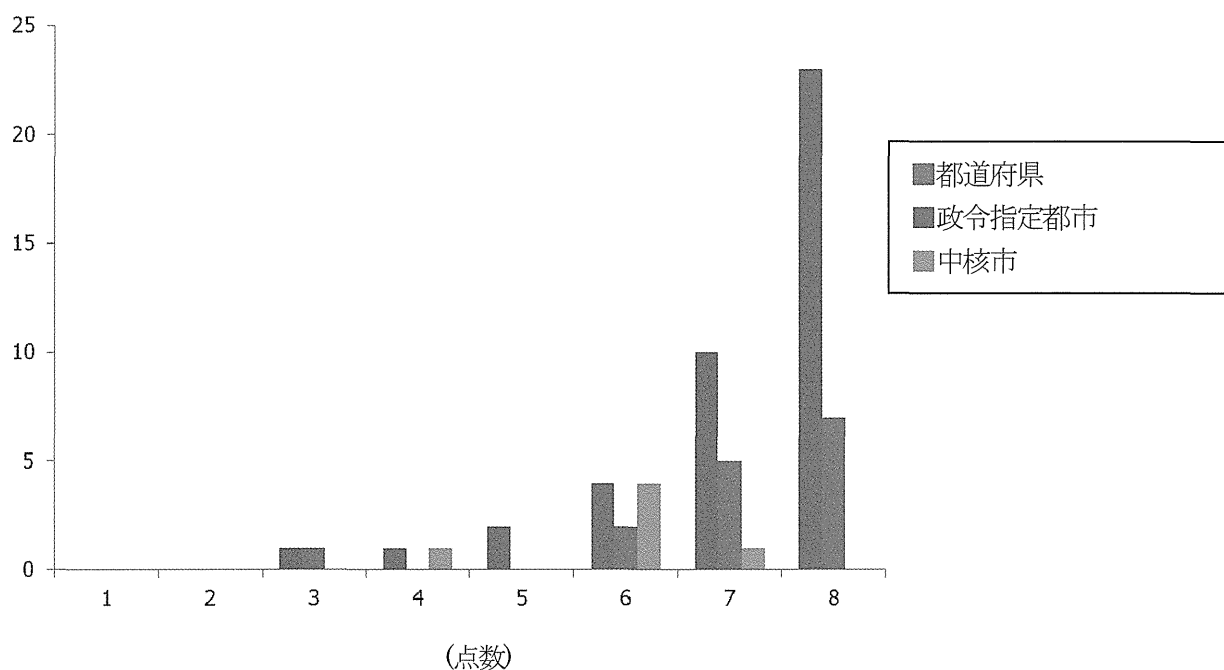


図1. 平成27年度ウイルス検査外部精度管理シーケンスおよび系統樹解析結果

表1. 項目別判定結果

	判定項目	適切	不適切
1-a	ミスリードの有無	57	5
1-b	解析長	58	4
1-c	プライマー配列の有無	48	14
2-a	塩基配列相同性検索	47	15
2-b	アミノ酸配列相同性検索	43	19
3-a	系統樹上の位置	60	2
3-b	系統樹の解析法	61	1
4	解析株の遺伝子型	62	0



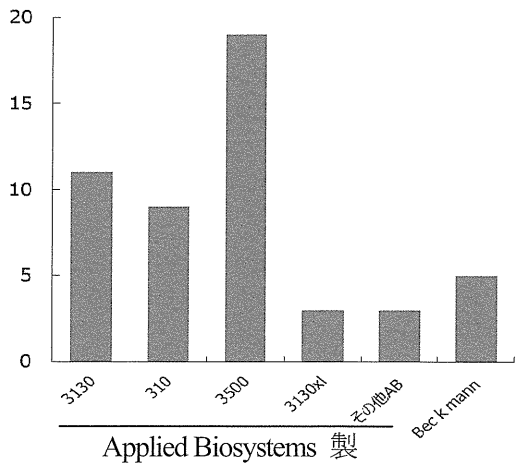


図2. 所持しているシーケンサー

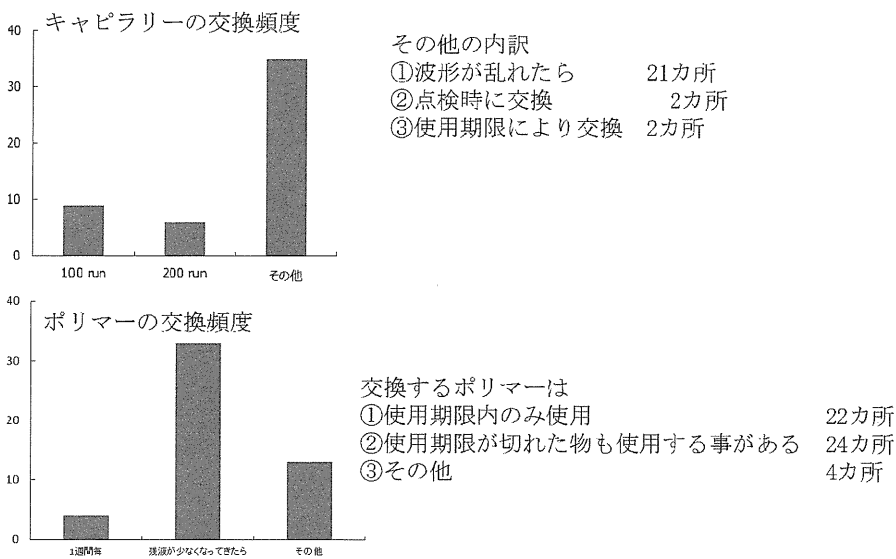
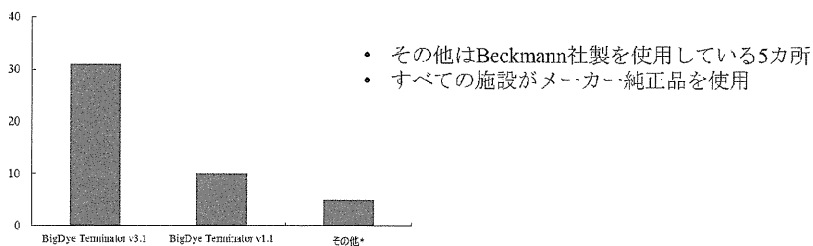


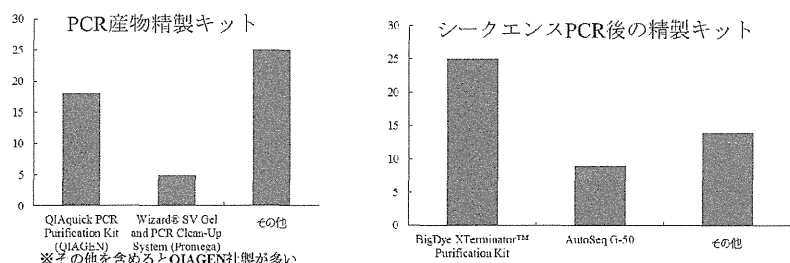
図3. シークエンサーに使用する試薬



試薬の使用法

<b>試薬は分注しているか</b> ①1回分毎に分注 2カ所 ②数回分毎に分注 31カ所 ③その他 7カ所	<b>試薬の凍結融解の回数</b> ①1回のみ 3カ所 ②3回程度まで 14カ所 ③4-5回 2カ所 ④10回以下 1カ所 ⑤決まり無し 29カ所	<b>試薬の使用期限</b> ①使用期限内のみ 21カ所 ②使用期限が切れも使用 21カ所 ③その他 8カ所
--	--	---

図4. シークエンス反応試薬



試薬の使用期限		試薬の使用期限	
①使用期限内のみ	20カ所	①使用期限内のみ	22カ所
②使用期限が切れも使用	25カ所	②使用期限が切れも使用	22カ所
③その他	5カ所	③その他	5カ所

マニュアル		マニュアル	
①読んだことがありほぼ理解している	40カ所	①読んだことがありほぼ理解している	34カ所
②読んだことはあるがあまり理解不十分	6カ所	②読んだことはあるがあまり理解不十分	9カ所
③読んだことがない	2カ所	③読んだことがない	3カ所
④その他	2カ所	④その他	3カ所

図5. 使用精製キット

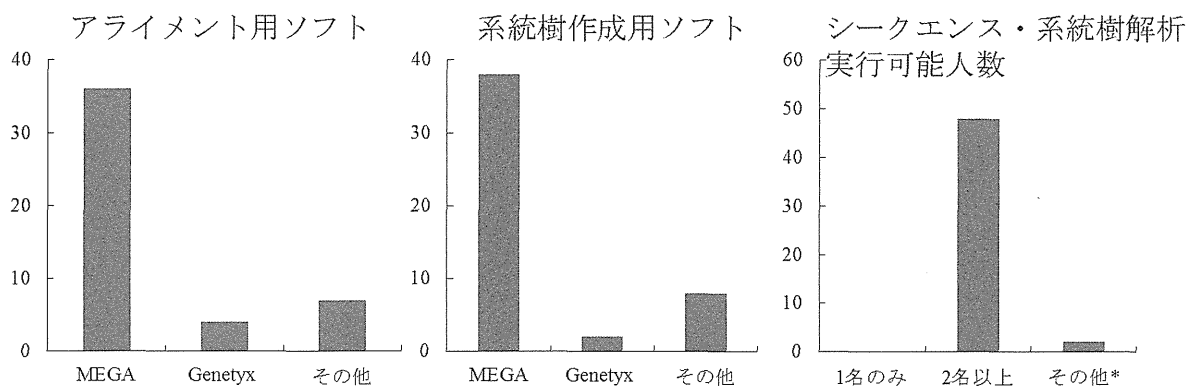


図6. 系統樹解析

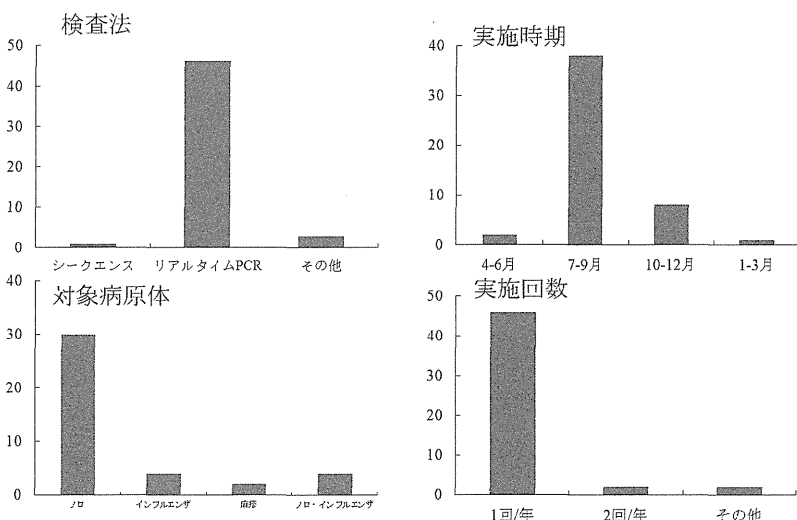


図7. 精度管理の対象と実施時期

検査に要した時間：15.2±13.5時間（平均値±標準偏差）  
最短5.5時間，最大72時間

精度管理に関する業務を分担して行ったか 精度管理に関する業務量はどうか

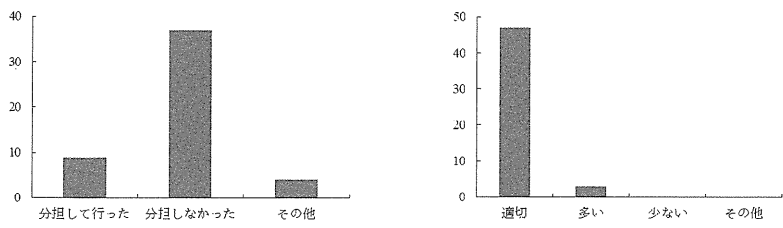


図8. 精度管理の実施

平成 27 年 9 月 XX 日

各衛生研究所所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会  
厚生労働「精度管理研究」班  
佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

地方衛生研究所精度管理研究班および精度管理部会による  
平成 27 年度外部精度管理（ウイルス検査）実施について

初秋のころ、貴職におかれましては、ますますご健勝ことと拝察いたします。

さて、ご承知のとおり、昨年度より、厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）の一環として、地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究—「精度管理研究」（研究代表者 佐多徹太郎）を開始いたしました。

本事業は、各衛生研究所の微生物検査の技術的水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入するとともに、全国的な精度管理の仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性の評価を目的とする「精度管理研究班」の研究として、地衛研精度管理部会とともに、外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを目的としております。

今回、下記および別添資料のとおり、ウイルス検査精度管理実施機関の募集および実施について、ご案内いたしますので、参加へのご検討とともに、ご協力につきましてよろしくお願いいたします。

記

1. 精度管理実施項目 ノロウイルスキャプシド遺伝子解析  
(シーケンス解析・分子系統樹解析)
2. 募集期間 9月25日(金)まで
3. 精度管理検体送付日(検体数) 10月上旬(1検体)
4. データ報告期日 平成27年11月13日(金)必着
5. 応募連絡先

厚生労働「精度管理研究班」・研究分担者  
国立感染症研究所 感染症疫学センター第6室長 木村博一  
TEL: 042-848-7133 (直通)  
E-mail: kimhiro@nih.go.jp および adpa2753@nih.go.jp

「地衛研精度管理研究班」による  
平成 27 年度外部精度管理（ウイルス検査）調査実施要領

1. 目的

本事業は、各地方衛生研究所（以下、地研）の微生物検査の技術的水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性の評価を目的とする「地衛研精度管理研究班」の研究として、外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを目的とする。今回、当該目的で適切に作製された試料を用いて、予め決められた試験検査法で実施し、検査結果とその解析および検査経過から検査実施上の問題点、データの精度に関する実態を把握することにより、近い将来、地研における感染症の病原微生物検査の信頼性確保および向上を図ることも目的としている。

2. 実施主体

外部精度管理の実施は、平成 27 年度厚生労働科学研究班（健康安全・危機管理対策総合研究事業）における「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業の体制の構築に関する研究」（略称「地衛研精度管理研究班」）に基づいて、ウイルス小班が主体となって実施する。なお、本研究班は地方衛生研究所全国協議会精度管理部会と国立感染症研究所の関連部から研究分担者ないし研究協力者で構成されている。

3. 今回の検査項目

ノロウイルス(NoV)キャプシド遺伝子解析（シークエンス解析・分子系統樹解析）

4. 配付試料の概要

試料到着時期：平成 27 年 10 月上旬(予定)

試料名：NoV ゲノム逆転写反応生成物または NoV ゲノム PCR 増幅産物

量：おおよそ 30 μl

個数：1 バイアル

備考：T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 緩衝液（Tris10mM/EDTA1mM）に生成物を溶解・凍結

5. 試料解析

1) 試料の保存及び検査方法

試料はマイナス 80℃で保存し、解析方法は精度管理実施手順を参考に実施する。

なお、精度管理実施手順は、参加機関のみに送付する。

2) 試料名

NoV ゲノム逆転写反応生成物または NoV ゲノム PCR 増幅産物

なお、精度管理試験実施者は、日常の当該項目の試験検査担当者とする。

6. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書等の提出

精度管理参加各機関は、試験検査およびデータ解析終了後、以下の資料を作成し、提出すること。

1) 地衛研精度管理研究班による精度管理報告の電子ファイルデータおよび印刷物を提出する。なお、参加機関には、電子メールにて、別途、試料と同時期にファイルを送付する。送付されたファイルに、各機関における測定試薬、反応条件および測定装置などの必要事項を入力後、下記宛にファイルを送付する。

2) 解析した塩基配列(FASTA 形式)および参照株・解析株による分子系統樹を提出する。系統解析法は、MEGA6 を用いた近隣結合法(NJ 法)とする。

また、作成した系統樹を A4 サイズに形式を揃え、PDF ファイルで提出する（系統樹原本は各機関で保存す

別添資料 2

ること)。

なお、精度管理報告書および測定ファイルの様式の変更をしないこと。

3) なお、関連するアンケート調査を行う場合は対応方、よろしくお願ひします。

7. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告提出期限および送付先

平成27年11月13日(金) 必着

8. 研究班員

研究代表者 佐多徹太郎	富山県衛生研究所
水越文徳	栃木県保健環境センター
小林美保 塚越博之	群馬県衛生環境研究所
貞升健志	東京都健康安全研究センター
山下照夫 皆川洋子	愛知県衛生研究所
小沢正次	富山県衛生研究所
藤井理津志 岸本壽男	岡山県環境保健センター
濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
勝見正道	仙台市衛生研究所
小澤広規	横浜市衛生研究所
松島勇氣 清水英明	川崎市健康安全研究所
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
長澤耕男 影山務 野田雅博 吉田弘 駒瀬勝啓 宮崎義継 木村博一	国立感染症研究所

9. 解析データ送付先・問い合わせ先

国立感染症研究所感染症疫学センター 木村博一

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所感染症疫学センター第6室

E-mail: kimhiro@nih.go.jp, TEL: 042-848-7133 (直通)

平成27年10月19日

地衛研精度管理研究班による  
平成27年度外部精度管理（ウイルス検査）実施手順

**【精度管理内容】**

地衛研精度管理研究班による平成27年度外部精度管理（ウイルス検査）実施要領に基づき、送付した試料に含まれる NoV キャプシド遺伝子の塩基配列解析および分子系統樹解析を実施する。

**【操作法】**

PCR 法による NoV キャプシド遺伝子増幅、ダイレクトシーケンス法および近隣結合法(NJ 法)により、配布試料中に含まれる NoV ゲノムのキャプシド遺伝子の塩基配列解析および分子系統樹解析を下記の手順を参考に実施する。なお、解析試料は、急性胃腸炎患者由来検体から核酸抽出および RT-PCR により得られた NoV キャプシド遺伝子産物(amplicon)である(配布量：約 30 $\mu$ l)。以下の大まかな手順により、試料の解析を行う。

1. 試料中に含まれる NoV キャプシド遺伝子増幅
- ↓
2. Sequencing Sample の調製
- ↓
3. シークエンサーセットアップ・解析
- ↓
4. 相同性解析と分子系統樹解析

**1. PCR 法による試料中に含まれる NoV 遺伝子増幅法**

下記のプライマーを用い、配布試料中の NoV キャプシド遺伝子を増幅する。なお、試料添加量、プライマーおよび PCR 条件(温度、反応時間など)以外の試薬・機器などについては、各機関で使用している試薬・機器を使用してもよい。

**1.1. 使用プライマーと配列**

配布試料の NoV キャプシド遺伝子増幅には下記のプライマーを使用する(図 1, 2)。

COG2F: 5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3'

G2-SKR: 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3'

**1.2. PCR**

下表を参考に PCR を実施する。

表 1. PCR-Mix の組成

DNase/RNase free water	18 $\mu$ l
COG2F (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
G2-SKR (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
PerfectShot <sup>®</sup> Ex Taq	25 $\mu$ l
配布試料	5 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

**2) PCR 反応**

増幅は 94 $^{\circ}$ C 3分を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 1分・50 $^{\circ}$ C 1分・72 $^{\circ}$ C 2分を 40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 15分を 1

## 別添資料 3

サイクル行う。

### 3) 電気泳動

PCR 産物 8  $\mu$ l を 1.5%アガロースゲルで泳動する。

### 4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液で染色する(TAE 溶液 100 ml にエチジウムブロマイド 10 mg/ml を 10  $\mu$ l 添加、20 分間染色)。

### 5) NoV キャプシド遺伝子増幅産物の確認

染色したゲルを UVB 照射・写真撮影後、増幅産物の確認を行う。

## 2. シークエンス試料の調製

### 2-1. Templates の調製 —PCR products の精製—

PCR products の精製は、PCR 反応液から酵素、ヌクレオチド、塩類、その他不純物を除去し、目的の PCR 産物だけを得るための操作である。現在、精製のためのキットは複数市販されている。ここでは QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた方法を紹介する。

#### (1) 試薬・器具

QIAquick PCR Purification Kit : QIAGEN, Cat.No. 28104

エタノール

Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) 以下「DW」

マイクロピペット

マイクロチップ

1.5 ml マイクロチューブ

高速遠心機

#### (2) QIAquick PCR Purification Kit による PCR products の精製

1) 1.5ml チューブに PCR 産物 1 容量に対して 5 倍量の Buffer PB を加えて混合する。

(PCR 産物の量は電気泳動のバンドの濃さで決める)

2) 溶液の色が黄色 (PCR 産物添加前の Buffer PB の色と同様) であることを確認する。

Buffer PB は pH7.5 の時、黄色。溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M 酢酸ナトリウム(pH5.0) を 10  $\mu$ l 添加して混和すると、溶液の色が黄色になる。

3) Spin Column の中央に 1) を加える。

4) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)。

5) 濾液を捨てる。Spin Column を再びコレクションチューブにセットする。

6) Spin Column の中央に 750  $\mu$ l の Buffer PE (96-100% エタノールを 24 ml 添加) を加える。

7) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)。

8) 濾液を捨てる。Spin Column は再びコレクションチューブにセットする。

9) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)

10) Spin Column を新しい 1.5 ml チューブに移す。

11) Spin Column の中央に 30  $\mu$ l の Buffer EB を加え(添加量で濃度調整)、1 分間静置する。

12) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)

13) Spin Column を捨て、得られた精製物をシークエンスに用いる。

#### (3) 精製 PCR 産物の濃度確認

1) 精製 PCR 産物 3  $\mu$ l と 6 $\times$ BPB 1  $\mu$ l を混合し、1.5%アガロースゲルで電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等の核酸染色試薬で染色する。

2) UV 照射下で写真撮影する。



### 別添資料 3

分子量マーカーと比較し、バンドの濃度確認を行い、Cycle Sequence 反応 mixture 調整時に加える精製 DNA 量を決定する。ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit では、PCR 産物が 200~500 bp のとき精製 DNA が 3~10 ng 必要である。

- ・分子量マーカーとほぼ同等：精製 DNA を 1~3  $\mu\text{l}$  使用
- ・分子量マーカーより薄い：精製 DNA を 3~6  $\mu\text{l}$  使用
- ・分子量マーカーより濃い：精製 DNA を DW で希釈して使用または精製 DNA を 1  $\mu\text{l}$  使用

#### 2-2. Cycle Sequence 反応 —Dye Terminator 法—

ddNTPs に蛍光が標識されている Dye Terminator 法を利用した ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequence Kit を用いて行う。

##### (1) 試薬・器具

ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit : Applied Biosystems Cat.No. 4337455(100 反応)

Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) 以下「DW」

マイクロピペット

マイクロチップ

0.2 ml マイクロチューブ

##### (2) ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた Cycle Sequence 反応

1) 反応液の調整をおこなう。

DW	X $\mu\text{l}$
5 × Sequencing Buffer	2 $\mu\text{l}$
Primer (2.5pmol/ $\mu\text{l}$ )*	2 $\mu\text{l}$
2.5 × Big Dye Ready Reaction mix	4 $\mu\text{l}$
精製 amplicon	Y $\mu\text{l}$
Total	20 $\mu\text{l}$

\* : Primer は PCR で用いたものを使用し、Forward primer と Reverse primer を別々の反応系に分けて行う。

X : DW で Final Volume (20  $\mu\text{l}$ ) になるように調整する。

Y : 精製 DNA は電気泳動 (3  $\mu\text{l}$ ) し、バンドの濃さを確認後、反応に用いる量を定める。

##### 2) Cycle Sequence 反応

ミスアニールを防ぐため、90°C以上を上昇してからサーマルサイクラーにチューブをセットする。

96°C 1 min  
96°C 10 sec ─┐  
50°C 5 sec 25cycle  
60°C 4 min ─┘  
4°C hold

なお、サーマルサイクラーの機種により上記条件が異なる場合がある(キット添付文書を参照)。

#### 2-3. シークエンス産物の精製 —スピンカラム精製—

余剰な Dye Terminator を除くため、エタノール沈殿または、カラム精製を行う。精製は多くの方法があり、またキットも多数市販されている。通常のノロウイルスのシークエンス検査で使用している方法を用いてよい。ここでは Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (Edge Bio) を用いた方法を紹介する。

## 別添資料 3

### (1) 試薬・器具

Edge Bio Performa® DTR Gel Filtration Cartridges

Cat.No. 98780 (36 カラム)

Cat.No. 42453 (108 カラム)

マイクロピペット

マイクロチップ

1.5 ml マイクロチューブ(Edge Bio)

高速遠心機

### (2) Performa® DTR Gel Filtration Cartridges を用いた未反応ダイターミネーターの除去

- 1) カラム内には、滅菌水で膨潤済みのゲルが充てんされているゲルカートリッジが入っている。カラムが装着されたチューブを遠心機に入れ、3,000rpm で3分間遠心（室温）。
- 2) 遠心によって落ちた滅菌水が入ったチューブを捨て、カラムを新しい1.5ml チューブに移しかえる。
- 3) サンプルをゲル中央に添加する。その際、ピペットの先端をゲルにつけないようにする。
- 4) 3,000rpm、3分間遠心（室温）。
- 5) チューブに精製産物が落ちていることを確認し、カラムを捨てる。

## 3. シークエンサーセットアップ・解析 —ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer によるシークエンス—

### (1) サンプルのセット

- 1) ABI PRISM 本体のドアが閉じられており、電源が入っていることを確認する。電源が入っている場合は、本体前面左下の緑色の LED が点灯している。
- 2) コンピューターの電源を入れ、Windows にログオン (INSTR-ADMIN)する。
- 3) コンピューターが完全に起動 (3500 Server Monitor が起動し、画面右下の☑の表示を確認)したのち、デスクトップ上のショートカットから「3500series」を起動させる。
- 4) 「DashBoard」上で、消耗品のステータスが有効であることを確認する。経過している場合は必要に応じて交換する。。
- 5) 「Tray」ボタンを押し、オートサンプラーを手前に異動させる。動作が停止したら、ドアを開け、プレートを取り出す。
- 6) 各ウェルにサンプルを添加する。サンプルを入れないウェルには、Hi-Di™ Formamide を 10 µl 添加する。オートサンプラーにサンプルをセットしたサンプルトレイをのせる (右奥が A1 の位置になり、逆向きにセットするとトレイがきちんとはいらないようになっている)。
- 7) 装置の扉を閉める。  
扉が開いている場合は本体前面左下のオレンジ色の LED が点灯している。  
(装置は 50°C に達するまで Run を開始しないため、あらかじめ DashBoard にある「Start Pre Heat」を押し、温度を上げておくとすぐに Run を開始する。)

### (2) サンプルシートの作成

- 1) 「DashBoard」から「Creat Plate from Template」を選択すると「Open Plate Template From Library」ダイアログボックスが現れる。
- 2) 事前に用意したテンプレートのうち、サンプルの長さに応じて適切なモードを選択し「Open」をクリックする。

Run Module	Run time	解読鎖長
Short Read Seq	≤30 分	>300bp

### 別添資料 3

Rapid Seq	≤40 分	>500bp
Fast Seq	≤65 分	>700bp
Std Seq	≤125 分	>850bp

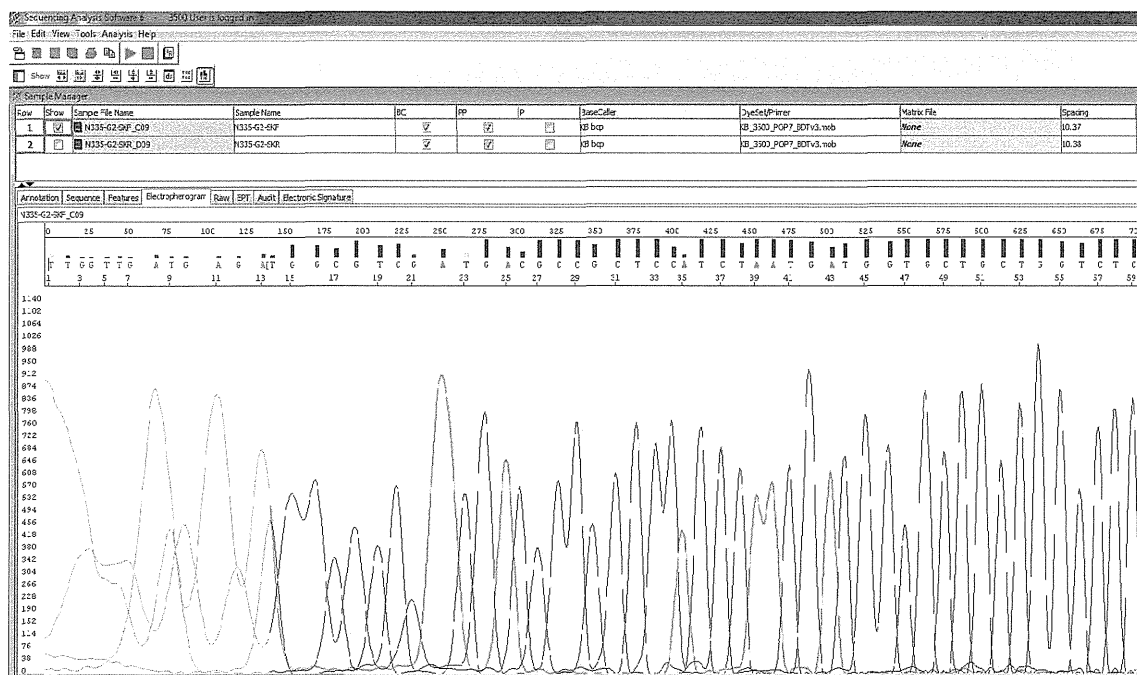
3) 「Plate Details」のページにて、プレートに名前を付け（のちにサンプルファイルフォルダ名に利用される）ウェルのタイプ（96 ウェル）を選び、「Assign Plate Contents」をクリック。

### (3) インジェクションリストの作成

- 1) ウェルに対応するサンプル名を入力する。
- 2) 各ウェルの Assay（「Assay」→「Action」→モードの選択（反応試薬のバージョンや精製方法に注意し読みたい長さに合わせたモードを選択）、File Name Convention、Results Group を指定し「Link Plate for Run」をクリック。
- 3) 「Injection List」にて、Run の詳細（モード、サンプルネーム、プレートの位置等）を確認。
- 4) 「Run」ボタンをクリックする。50℃に達すると作動する。  
装置が作動しているときは本体前面左下の緑の LED が点滅している。

### (4) データ解析

- 1) デスクトップ上のショートカットから「SeqA6」を起動させる。
- 2) 「File」→「Add samples」をクリックし、Sample Manager に加えたいファイルを選ぶ。
- 3) ファイルを全て加えたら「OK」ボタンをクリックする。選んだサンプルファイルは Sample Manager に加えられる。
- 4) サンプルファイル名をダブルクリックすると Electropherogram (下図) が表示される。



5) 「Analysis」→「Start Analysis」したのち、「save」で保存する。データは、「¥Computer¥AB SW&DATA(D)¥DATA」内に保存される。

6) Raw Data より Peak1 Location (解析時に蛍光色素の違いによるモビリティシフトの補正を行うための基準点)を確認する。

Raw Data に表示されている波形の最初のピークの立ち上がりカーソルをあわせ、クリックしたままにすると、位置を示すラインが現れ、上部にデータポイント数が表示される。この数値を「Peak1 Location」カラム

に再入力し再解析を行う。このとき「Start Point」カラムの値も Peak Location に再入力した値と同じ値を再入力する。余剰な Dye Terminator 等により始めに高いピークが現れたときは、ピークの終わった後の最初のピークの立ち上がりにあわせる。

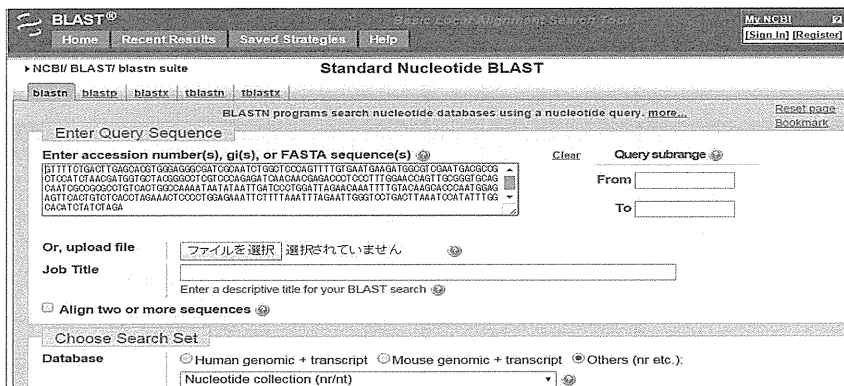
Raw Data の終わりの方を表示させ、波形が終わっておりフラットな状態(Electropherogram では塩基「N」が表示される) になっていれば、ピークの最後にあわせ、データポイント数を「Stop Point」に再入力する。なお、再解析は必要な場合、「A」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。

- 7) 必要に応じて解析結果を印刷する。  
印刷は、「P」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。
- 8) 解析後の塩基配列のテキストファイルを作成する。  
「Factura Settings File」のポップアップメニューから、「Seq Txt」を選択し、「F」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。
- 9) 解析終了後、「310 Data Collection」、「Sequencing Analysis」を終了させる。
- 10) データはデスクトップ上の Run フォルダのショートカットに保存されている。  
CD-R や FD にデータをコピーする。
- 11) 本体装置の扉を開け、左側にある「Tray」ボタンを押し、オートサンプラーを手前に移動させる。サンプルトレイを外し、サンプルは廃棄する。装置の扉を閉める。

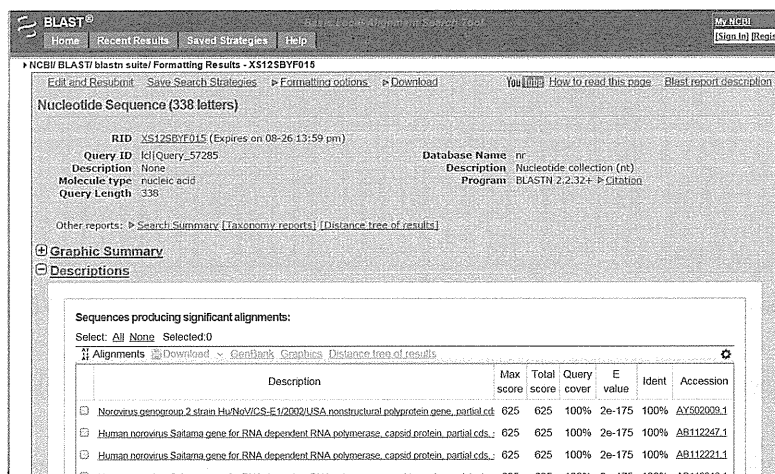
#### 4. 塩基配列およびアミノ酸配列相同解析

塩基配列が決定されたら、キャプシド遺伝子の約 340 塩基長について BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 検索により相同性解析を行う。

- 1) 塩基配列を入力し、画面下の「BLAST」をクリックする。



- 2) 検索が終了すると、検索結果ページに画面が移り、類似性の高い配列がスコア順にリス



アミノ酸配列に関しても、「protein BLAST」にて同様に解析を行うことができる。