

平成 28-29 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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築  
に関する研究（H29-健危-一般-002）  
分担研究総合報告書

感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査（EQA）導入の研究

研究分担者	吉田弘	国立感染症研究所
研究協力者	板持雅恵	富山県衛生研究所
	伊藤雅 皆川洋子	愛知県衛生研究所（レファレンスセンター）
	小澤広規	横浜市衛生研究所
	木田浩司	岡山県環境保健センター
	北川和寛	福島県衛生研究所（レファレンスセンター）
	佐野貴子 近藤真規子	神奈川県衛生研究所（レファレンスセンター）
	高橋雅輝	岩手県環境保健研究センター
	長谷川道弥、新開敬行	東京都健康安全研究センター
	豊嶋千俊、山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所（レファレンスセンター）
	中田恵子	大阪健康安全基盤研究所（レファレンスセンター）
	西澤香織	熊本市環境総合センター
	峯岸俊貴	埼玉県衛生研究所
	吉富秀亮、濱崎光宏	福岡県保健環境研究所（レファレンスセンター）

研究要旨 5類小児科定点把握疾患の手足口病は臨床診断による報告を基本にしている。平成28年4月より施行された改正感染症法では、積極的疫学調査により地方衛生研究所にて実施する手足口病検査にも、一定の検査の質を担保することが求められることとなった。このため検査体制が異なる実情を踏まえ、検査の質を担保する外部精度管理調査（EQA）の導入方法について研究を行った。本研究では国内外で普及している CODEHOP-snpPCR 法を題材としてその調査方法、内容を検討した。初年度は EQA 用試料の送付、保管条件の検討を行い、2年目は手足口病のウイルス検出感度と遺伝子検査の質について、12施設の協力を得て試行的に EQA を行い、調査内容、導入可能性について検討を行った。

その結果、検査試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA はウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報、施設間塩基配列の差異の情報、を収集し検査系の改善を目的として参加者へ還元する調査内容であること、施設内で機材保守、内部精度管理の実施など PDCA を動かすためのメカニズム構築が必要であること、EQA 参加施設のみならず、地方衛生研究所間で情報共有し、2類感染症であるポリオ対応のため国内のサーベイランス体制の向上に向け活用すべきであること、2年間の研究により少数の参加施設ならば比較的容易に市販の非感染性試料を用いて他の疾患に対しても EQA をパッケージ化可能であること、病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要であること、が認められた。

## A . 研究目的

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下感染症法）における5類定点把握疾患のうち主に小児科定点で報告される手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎患者に対する病原体検査では多様な血清型のエンテロウイルスが検出されることが知られている。

そして手足口病、ヘルパンギーナは主にエンテロウイルスA群（EV-A）による感染が原因である。これらエンテロウイルス感染症は夏 - 秋季を中心に比較的大きな流行が見られる。1981年より開始した感染症発生動向調査事業では、手足口病、ヘルパンギーナは臨床鑑別診断による報告が感染症法12条に規定され、全国の発生状況が速やかに還元されている。これらエンテロウイルス感染の多くの場合予後は良好であるが、手足口病の原因の一つであるエンテロウイルス71感染ではまれに重篤例が報告されており、またCA6感染では、強い発疹像や爪甲脱落症を伴うケースも報告されている。なお一部をのぞき、エンテロウイルス感染症には有効なワクチン、抗ウイルス薬は存在しない。

このため積極的疫学調査の一環として、地方衛生研究所等では小児科定点の一部より検体を収集し、流行の原因を詳細に解析するため、血清型、遺伝子型等の解析を行ってきた。またウイルス同定結果の情報を全国共有することで、我が国の感染症対策に貢献している。

従来エンテロウイルス検査は感受性のある培養細胞を用いたウイルス分離と型特異的な抗血清による中和試験を用いて同定が行われてきた。ウイルス分離による株収集は、詳細なウイルスゲノム解析に重要な技術であり、型特異的な抗血清を用いた中和反応による同定法は抗原性解析に必須な手法である。しかし、これらのウイルス分離・同定による検査は、結果を得るのに数週間必要なことから、近年では、遺伝子検査によるエンテロウイルス同定が普及している。

遺伝子検査によるエンテロウイルス同定は主要な抗原決定部位を含むVP1領域のウイルスRNA

を増幅し、塩基配列を調べ、標準株（参照株）との比較により75%以上一致するものを、当該血清型とすることと定義されている。しかしエンテロウイルスの血清型は100種類以上が知られ、各血清型内のVP1領域も遺伝的に多型なことから、これまで多くの種類のプライマーが提唱され、各検査室で適宜組み合わせ用いられてきた（参考文献1）。

一方、エンテロウイルスは感染成立後、咽頭より糞便中に長期間排泄されるため、検査材料としては糞便を用いる方が検出率は高い。しかし採取面から、近年では咽頭拭い液を検体として用いる傾向にある。後者の場合、ウイルス量が少ない場合が多く、高感度な検出方法が求められてきた。またエンテロウイルス検査は広範囲な血清型を検出する必要がある。両目的を満たす手法（CODEHOP-semi nested PCR法）が米国CDCのNixらによって開発され（参考文献2）国内外で本法を導入している検査室は増加している（WHO-CDCマニュアル [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf)）。なお本法でポリオウイルスも検出可能である。

平成28年4月に施行された改正感染症法では5類定点把握疾患の病原体検査についても一定の信頼性を担保することが求められている。しかし各地方衛生研究所の検査体制は様々であり、検査の質を統一した基準で評価することは困難である。先行研究班（佐多班）で実施した地方衛生研究所向けのアンケート結果では手足口病を対象としたEQA実施について要望が多かったことを報告している。本研究では、地方衛生研究所における検査実施体制が異なる現状を踏まえ、手足口病の病原体検査に、国内外で普及しているCODEHOP-snPCR法を題材とした外部精度管理調査（EQA）の導入方法を検討することとした。

初年度はCODEHOP-snPCR法による検査プロセスを評価するためのEQA用試料（エンテロウイル

ス RNA) の調製条件と保管輸送方法の検討、手足口病病原体検査の信頼性の指標、について検討をした。初年度の結果を踏まえ、2 年次は 12 施設の協力を得て、CODEHOP-snpCR 法によるウイルス検出感度の比較、塩基配列による同定法の比較、を行った。

今般、コスト面を含め EQA 実施の可能性、調査結果の考察を行い、CODEHOP-snpCR 法以外の遺伝子検査法への応用可能性について検討したので報告する。

## B . 研究方法

### 初年度

CODEHOP-snpCR の EQA に用いる市販ウイルス RNA (コントロール用試薬) の保管条件とゲノムコピー (GC) 数の関係について検討を行った。

#### 1 .市販 RNA コントロールとウイルス力価の比較

1 )ウイルス: RD-A 細胞に EV71 BrCr 株を接種し CPE が+4 になった時点で回収した。凍結融解(1 回)後、3000rpm で遠心し、上清を回収した。1ml に分注し、-30 度保管した。巻き込み法(細胞数は  $1.0 \times 10^5$ /ml)により、力価を測定した。

2 )RNA 抽出: 力価を測定した EV71 BrCr 株を用いて QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit にてウイルス RNA を精製した。

3 )市販 RNA: 市販の RNA コントロールの評価のために VirceII 社の EV71 BrCr 株陽性コントロール RNA を用いた。添付マニュアルに従い 19,800 GC/uI (50uI) を調製した。

#### 2. ウイルス RNA の検出法

##### 1 ) CODEHOP-snpCR

Nix 等の方法(参照文献 2)に基づいた。なお反応系は 1/2 容量(25uI)とし、RNA は 2.5uI 用いている。電気泳動は 2% アガロースゲルで行い、5uI をアプライし、増幅産物をバンドの濃さで+1 から+4 を目視で判定した。なお本法はエンテロウイルスゲノムの VP1 から VP3 領域の約 900bp につ

いて逆転写反応を行い、1<sup>st</sup> PCR で約 760bp、2ndPCR で約 350bp を増幅する検出系である。

2 ) ウイルスゲノムコピー(以下 GC)数の測定  
ウイルス保管、回収条件を定量的に評価するために、Nijhuis らの方法を若干変更(参照文献 3)し、one step RT-qPCR にて 5' 非翻訳領域 155bp の増幅を行った。コントロールプラスミドには人工遺伝子合成サービスを利用した。容量は 25uI とし、RNA は 3uI 使用。反応試薬は Quantitech Multiplex RT-PCR (QIAGEN)を用いた。反応系は 2 穴ずつ用いた。

#### 3 . ウイルス RNA の保管条件

FTA Elute(Whatman), RNAstable (Biomatrix) の 2 種類を用いて、異なる濃度の RNA ウイルスを固定し、温度(室温、4 度、-30 度)を変え保管した。一定の期間の後、回収したのち、CODEHOP-snpCR で増幅の確認。そして RT-qPCR で GC 数の変動を測定した(図 1)。

##### 1 ) FTA Elute カードを用いたウイルス、ウイルス RNA 回収試験

FTA Elute カード(サークル径 11mm)に希釈ウイルス、ウイルス RNA、各々 40uI をしみこませ、3 時間風乾後、専用パウチに入れ保管した。

RNA 回収には 4mmパンチを用いて、2 枚打ち抜き、先行研究で用いた方法で RNA を回収した(参照文献 4)。

2 ) RNAstable を用いたウイルス RNA 回収試験  
自家調整ウイルス RNA、あるいは市販 RNA コントロール 10uI を RNAstable にアプライし、一晩キャビネット内で乾燥後、異なる条件下(温度、濃度)で保管した。RNA をリカバーした後 CODEHOP-snpCR で増幅の確認、そして RT-qPCR で GC 数を測定した。

### 2 年次

初年度検討した、CODEHOP-snpCR の EQA 用試料を用いて試行的に 12 施設の協力を得て調査を行った。

## 1 .手足口病検査に関わる EQA 試行調査参加施設数

エンテロウイルスレファレンスセンター6 か所（福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所）と研究協力者の所属機関6 か所（富山県衛生研究所、横浜市衛生研究所、岡山県環境保健センター、東京都健康安全研究センター、熊本市環境総合センター、埼玉県衛生研究所）の計12 か所（A-L 施設）に参加依頼を行った。

## 2 . 調査実施時期

EQA 試料は2017年12月4日発送。結果報告締め切りは12月25日とした（3週間）調査要領は別添資料 1 のとおり。

## 3 . 調査に用いた試料

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot 16MBC019001, 19,800 GC/uI)をEQA用RNA試料とした。本試料はEV71 BrCr株（標準株）をRD細胞で増殖後、ウイルスを不活化後、精製RNAを乾燥した製品である。本RNA試料を保管、送付するためRNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)を用いた。RNAstableに固定した試料をリカバーするためにTE buffer (pH8.0)を用いた。

CODEHOP-snpPCR法によるウイルス検出感度の比較（エンドポイント比較）のため、RNA試料をTEでリカバー後、メーカー表示換算4,400 GC/uI（Sample1）、塩基配列による同定用試料としてメーカー表示換算2,200 GC/uI（Sample2）になるよう1.8mlチューブに分注、乾燥固定し、リカバー用TE buffer (pH=8.0)1本とともに計3チューブを宅配便（冷凍）にて参加機関に送付した（図2）。即ちSample1と2の違いは濃度のみである。

## 4 .エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

エンドポイント測定用試料の再現性を確認するため、事前に2施設（ア、イ）で検討を行った。Sample1として準備する同一ロットのRNAコントロールをメーカー表示換算4,400 GC/uIになるよう調製し、2施設で各3本ずつエンドポイントを比較し再現性を確認した。また送付時の安全性を確認するためSample1として調整する前の試料10uI（13,200GC/uI）をRD-A細胞に接種し、2代継代を行い、感染性の有無を確認した。

## 5 . エンドポイント測定

### 1 ) 方法と報告内容

- Sample 1 を 30uI TE buffer にてリカバー
- 10 倍希釈列（ $10^{-1} \sim 10^{-3}$  まで）を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いてCODEHOP-snpPCRを実施し、エンドポイントを確認（原液、-1、-2、-3）。
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイント判定結果とともに報告することとした。なお測定回数は参加施設の任意としている。

### 2 ) 比較に必要な情報

PCR使用機器名、反応系（逆転写，1st PCR，semi nested PCR）のに用いた酵素の種類、反応に用いたテンプレートの容量、電気泳動の条件（ゲル濃度、アプライ量など）についてエンドポイントとともに報告を求めた。

## 6 . 塩基配列による同定法の比較

### 1 ) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30uI TE で、Sample 1 と同様リカバー
- CODEHOP-snpPCR法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法でPCR産物を精製し、塩基配列解析を行い、同定し結果報告することとした。

### 2 ) 比較に必要な情報

塩基配列による同定法、同定に用いた編集済み塩基配列データ、ABI ファイルのデータを同定結果とともに報告を求めた。

## 7. EQA のパッケージ化検討

EQA 試料準備、送付に必要な費用、他の利用可能な EQA プロバイダとの比較を行った。

## 8. 倫理面の配慮

個人情報を取り扱わない。

## C. 研究結果

### 初年度

#### 1. ウイルス力価と CODEHOP-snPCR による検出と GC 数の関係

手足口病検査の信頼性評価を目的とした外部精度管理調査用試料は、ウイルス、ウイルス RNA、市販のウイルス RNA コントロールを用いることが想定される。病原体サーベイランスにおける検査の質管理の基準を検討するために、ウイルス感染価と今般検討を行う CODEHOP 法による検出可能なウイルス GC 数の関係を調べた。

用いた EV71 (Br Cr 株) の力価は RD-A 細胞を用いた場合、マイクロタイター法で  $10^{6.5}$  CCID<sub>50</sub>/50uI であった。ウイルスから RNA を精製後、 $10^{-1}$  から  $10^{-8}$  までの 10 倍希釈列を作製し、2.5uI の RNA を用いて CODEHOP-snPCR による検出、3 uI の RNA を用いて RT-qPCR による GC 数を測定した (図 1)。同様に市販の RNA ( $2.0E+04$  GC/uI) を希釈し CODEHOP 法で検出し、ウイルス力価と GC 数の関係を比較した (図 3)。なお 市販 RNA コントロールのメーカー表示 GC 数と、実測値の間にはおよそ 1:0.7 倍の関係が認められている。その結果 CODEHOP 法では自家調製 vRNA を  $10^{-8}$  まで希釈したとき ( $10^{-1.5}$  CCID<sub>50</sub>/50uI = 0.03 CCID<sub>50</sub>/50uI 相当) でも目視でバンドが確認、RT-qPCR では RNA を  $10^{-7}$  希釈 ( $10^{-0.5}$  CCID<sub>50</sub>/50uI = 0.3 CCID<sub>50</sub>/50uI 相当) したときでも数コピー検出できた。したがっていずれかの方法で検出す

れば理論上、1 CCID<sub>50</sub>/50uI (数十コピーに相当) 以下の感染価の時でも、ウイルスゲノムが検出できることになる。

他方市販 RNA コントロール (メーカー表示 19,800 GC/uI) は CODEHOP 法により 200 倍希釈即ちメーカー表示換算 99 コピー (実測値 70 コピー) まで再現性をもって検出可能であったが、RT-qPCR では数コピー/uI まで検出可能であった。

このように、検出方法により検出下限が異なる理由は、CODEHOP 法で逆転写する領域 (約 900bp) は RT-qPCR の増幅領域 (155bp) より長いため、安定的に増幅可能な鋳型の含有量が異なっていること、RT-qPCR は 5' 非翻訳領域、CODEHOP 法は VP1 領域であり、増幅効率が異なる可能性があること、が原因と考えられた。このため外部精度管理調査用に用いる RNA 調製には CODEHOP 法による検出下限値と対応する GC 数の関係を事前に測定しておく必要がある。

更に、感染価 1 CCID<sub>50</sub> 以下に相当する数 ~ 数十コピーの鋳型 RNA は CODEHOP-snPCR で検出できても、シーケンス反応による遺伝子配列による同定には困難なことが多い。そのため、精度管理用試料調整時には、CODEHOP 法による検出できる鋳型の GC 数と感染価の関係を把握したうえで、目的に応じ RNA の濃度を調製する必要があると考えられる。(図 3)

#### 2. 外部精度管理用試料の送付方法の比較

外部精度管理用 RNA を配布する場合、輸送、保管中に安定性が担保されることで、調査に参加する施設間の結果の評価が可能である。このため、RNA を安定的に送付する方法の検討を 2 種類検討した。

本研究では非感染性が担保された市販 RNA コントロールの配布を想定しているが、比較のためウイルス、そしてウイルスから精製した自家調製 RNA の結果も検討した。まず外部精度管理調査用試料送付に FTA Elute カードの適応可能性を検討した。

## 1) FTA Elute カードを用いたウイルス、自家調製ウイルス、市販ウイルス RNA 回収試験

FTA Elute カードにウイルスを固定すると、精製キットを使わず、比較的容易にカードから RNA が回収できることを先行研究 (参照文献 4) にて示している。

施設内変動を観察するため  $10^{-1}$  と  $10^{-2}$  に希釈したウイルス、精製したウイルス RNA について各々 40ul を FTA Elute カードに固定し、1 日後 (4 度保管) に 4 名の術者で回収を行った結果を図 4 に示す。

$10^{-1}$  希釈 ( $10^{5.5}$ CCID<sub>50</sub>/50ul)、 $10^{-2}$  希釈のウイルスは抽出後何れも比較的安定して検出でき、先行研究と同様の数%の回収率であった。次に精製ウイルス RNA の場合、 $10^{-1}$  希釈 (実測値  $2.3E + 06$  GC/ul) で 4 名とも同様の数%の回収率であったが、 $10^{-2}$  希釈では大きなばらつきが見られた (図 4)。

市販 RNA コントロールの検出感度は CODEHOP 法でも数十コピーが検出可能である。市販 RNA コントロールを FTA elute カードから回収後 100 コピーと 10 コピーになるよう希釈、調製した試料を FTA elute カードにアプライし、回収後 CODEHOP-snpCR を行い、4 名の術者で 3 回繰り返したがすべて陰性であった (データ示さず)。

先行研究で FTA Elute カードはウイルス力価が高いときは回収率に変動が少なく、低いと大きくなる傾向を示している。このように FTA Elute カードは、回収率は約 1/100 程度であるが、ウイルス力価が高い場合は比較的安定であり定性試験には簡便な保管方法である。今般検討したウイルス RNA 単独の場合でも回収率にばらつきがみられるものの、高濃度であれば EQA の定性試験には適応可能と考えられる。しかしながら低濃度 RNA の保管には適さないことが確認された。

## 2) RNAstable を用いたウイルス RNA、市販 RNA コントロールの回収試験

CODEHOP 法は高感度にウイルスゲノム検出可能な方法である。本法を導入する検査室間の信頼性

評価する方法のひとつは、同じ濃度の標準 RNA を配布し、各検査室でエンドポイントを測定することで検出感度の比較が考えられる。この目的には RNA の回収率のばらつきを小さくする必要がある。

非感染性で、かつ品質管理された多くの種類の市販の PCR 陽性コントロール用 RNA/DNA が入手できる。しかし市販品は高価なため、これを適宜希釈し、回収率が高い方法で保管できれば、EQA への応用は広がるものと考えられる。今般、さらに RNA を安定的に保存する製品、RNAstable を用いて保管し、自家調整 RNA を用いて保存した場合について比較した。

### 市販 RNA の RNAstable を用いた際の保管温度と回収率

市販 RNA (100 倍希釈液: メーカー表示換算 198 GC/ul 相当) 10ul を RNAstable チューブへアプライし乾燥させた。室温、4 度、-30 度にて 5 日保管後、DW (10ul) にて回収。CODEHOP-snpCR 法、RT-qPCR にて RNA を検出した。その結果、CODEHOP 法では 5 日後-30 度保管のみ RNA が検出できた。なお RT-qPCR による回収率は RNAstable 使用前の 1/3 程度に減少していた。また室温、4 度、-30 度とも回収できた GC 数はほぼ同じであり、温度環境が CODEHOP 法で増幅可能な鋳型 RNA の安定性に影響したと考えられた (図 5)。このため、155bp を増幅する RT-qPCR の場合は、室温保管でも問題ないと考えられたが、より長い配列を増幅する CODEHOP 用鋳型 RNA を RNAstable で調製する場合には、回収率と RNA の安定性を考慮し、さらに高い濃度 (数千 GC 数) で EQA 用に調製する必要が認められた。

### RNAstable で保管した市販 RNA のエンドポイント測定

市販 RNA (10 倍希釈液: メーカー表示換算 1,980 GC/ul 相当) を -30 度にて 5 日保管後回収、希釈し CODEHOP 法にて検出したところ、200 倍希釈 (メーカー表示換算 99 GC/ul、実測値 70 GC/ul 相当) まで検出可能であった。

以上により RNastable は FTA Elute カードに比べ回収率が安定しており、高濃度(数千 GC 程度)、短期間、冷凍条件であれば市販 RNA を安定的に保管でき、CODEHOP 法の施設間の検出感度の比較調査のために応用可能であることが確認された。

#### 施設内変動

つぎに施設内変動を調べるため市販 RNA (100 倍希釈液: メーカー表示換算 198 GC/uI 相当)10uI を 3 名の術者が、10 uI でリカバーしエンドポイントを測定したところ、1 名のみ原液のみ可能であった。このため RNastable からの回収方法を改善する必要性が認められた。そこで 2 年目の研究では、高濃度 (13,200GC/uI) の RNA 10uI を 30uI の TE buffer (pH 8.0) でリカバーし回収することとした。

#### RNastable による自家調整 RNA の保管温度と回収率

高濃度 RNA の安定性を確認するため自家調整ウイルス RNA を用いた実験を行った。ウイルス RNA 10uI を  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  に希釈し、室温、4 度、-30 度で保管後、TE (pH8.0) 20uI で回収し CODEHOP-snpPCR 法、RT-qPCR にて検出した。

いずれの希釈倍率、温度環境ともウイルス RNA は安定的に検出された。このことは比較的高濃度な RNA の場合、RNastable で安定して保管できることを示す (図 6)。

## 2 年次

### 1 .エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

2 施設で同一ロット試料 各 3 本に対してエンドポイント測定した結果、ア施設では 3 試料とも  $10^{-1}$  まで増幅を確認、イ施設では 3 試料中、2 試料が  $10^{-2}$ 、1 試料は  $10^{-1}$  まで増幅を確認できた。即ち、メーカー表示換算 440 GC/uI まで 2 施設で CODEHOP-snpPCR 法で再現可能であると判断された。

なおア施設では RNA 2.5uI を用いて、Superscript II (ライフテクノロジー) により逆転写反応を 5uI で実施。イ施設は PrimeScript

RT(Takara)により RNA10uI を用いて反応を 20uI で行った。1stPCR, semi nested PCR とともに総容量 25uI で測定している。

また高濃度の RNA 試料 (メーカー表示換算 13,200GC/uI) を RD-A 細胞に接種し、2 代継代 (全 14 日間) したところ製品説明書記載のとおり、不活化されていることを確認した。

## 2 .エンドポイント測定結果

### 1 ) 結果報告期間

2 施設で実施した、再現性試験を踏まえ、Sample 1 を同様に調製し、2017 年 12 月 4 日に一斉に送付。原則として 3 週間の期限内に全 12 か所より結果の回答があった。

### 2 ) エンドポイントの比較結果

あらかじめ約 4,400GC/uI (メーカー表示換算) に調製した RNA コントロールを  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  まで希釈列を作成しエンドポイントを測定。測定回数は任意 (1 回 ~ 4 回) とした。結果は以下の通り。なお図 7 では縦軸は希釈条件、横軸は報告機関数と、該当する 12 施設をアルファベットで表記した。

- 12 施設間で測定した結果、原液 (約 4,400 GC/uI) から 100 倍希釈 (44 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出され、施設間に感度に差が見られた。1000 倍希釈 (4.4 GC/uI ; メーカー表示換算) が検出された施設はなかった。
- 12 施設中 5 施設は 10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出可能であった。

### 3 ) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

図 8 に A-L 施設の反応条件の情報を示す。逆転写反応、1stPCR, semi nested PCR に用いられている酵素系について、米国 CDC が報告している試薬類を「手足口病検査マニュアル」で示しているが、同一なのは I、J 施設のみであり、残り 10 施設は各々異なっていた。また同一反応条件ではあるが I、J 間で検出感度に差が見られた。

施設 A,B は 100 倍 (44 GC/ul : メーカー表示換算) まで検出可能であったが酵素の種類は原法とは異なっていた。なお A,B では逆転写反応は同じ種類を用い、1<sup>st</sup> PCR と semi nested PCR には異なる DNA polymerase (3' 5' exonuclease 活性の有無) を用いていた。

CODEHOP-snpCR 法に用いるプライマーにはイノシンを含むため 3' 5' exonuclease 活性のある酵素系 (ExTaq) の増幅効率の低下が懸念されたが、検出感度の最も高かった A、B 施設の結果から本比較調査 (1 回測定) では差が認められなかった。

### 3 . 塩基配列による同定法の比較

あらかじめ 2,200 GC/ul (メーカー表示換算) に調製した RNA 試料 (Sample 2) を用いて 12 施設で CODEHOP-snpCR と塩基配列によるエンテロウイルスの同定を行った。その結果、全施設からエンテロウイルス 71 の回答を得た。なお、1 施設のみ増幅できなかつたため Sample 1 の増幅産物を用いて塩基配列を解析し、正答を得ている。

#### 1 ) 塩基配列による同定法

エンテロウイルス VP1 領域を用いた同定法は標準株配列と 75% 以上一致する配列を当該血清株とし、オランダ RIVM が Web 上で提供するタイピングツールも本原則に基づく。

塩基配列による同定法は 11 施設が RIVM タイピングツール、標準株配列との比較による同定を、単独あるいは複数組み合わせにより同定を行っていた (表 1)。

#### 2 ) 塩基配列の比較

12 施設の塩基配列と送付試料 BrCr 株の配列を (図 9) に示す。送付試料 EV71 BrCr 株の RNA を CODEHOP-snpCR による増幅した場合の増幅サイズは 354bp であり、プライマー領域を除くと 301bp である。図 9 は 301bp に揃えたアライメント結果を示している。

G 施設を除き 11 施設より回答のあった配列長は 301bp 以上であった。1 施設の配列長は 301bp

より短い。標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、同定には問題がないと判断された。

12 施設のアライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られた。図 9 では赤丸で示す。波形ファイルでは、多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた (図 10)。いずれも標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、塩基配列によるエンテロウイルス同定には問題がないと判断される。

### 4 . EQA パッケージ化の検討

前年度に実施した、RNA 試料の安定化条件、輸送・保管法の比較検討を踏まえ、市販品のエンテロウイルス RNA コントロールと、輸送に用いる RNA stable の組合せにより、少数の調査なら比較的簡便に EQA を実施可能であることが示された。

今般実施した 12 か所であれば、エンドポイント比較とシーケンス比較、準備から送付まで 1 人で対応可能である。また宅配便による冷凍輸送利用で費用は 1 か所輸送費込み 2 万円以下であり、民間が実施する EQA と費用の面でも大きな差が出ないことが示された (図 11)。ひな形を別添資料 2 に示している。

### D . 考察

本研究では、感染症発生動向調査による 5 類小児科定点把握疾患の一つである手足口病検査について、EQA 導入の検討を行った。手足口病は主に EV-A 群が起因ウイルスである。かつては乳のみマウスを用いた CF 試験、培養細胞と特異的中和抗血清を用いたウイルス分離・同定試験、が主な検査法であり、分離株を得るためには今も有用な手法である。しかし施設維持、手技習得期間、細胞への感受性、検査時間などの要因もあり、臨床材料から直接ウイルスゲノムを増幅後、塩基配列解析により同定を行う遺伝子検査法が普及している。

積極的疫学調査の一環で実施するエンテロウイルス検査は、検体採取、検査方法の選択など地方衛生研究所の裁量で選択する部分は大きいものの、全国調査により、血清型の検出状況を還元する病原体サーベイランスの目的からは、一定の検出感度、精度が担保されることが求められる。本研究では、手足口病検査に提供される検体は咽頭ぬぐい液が多いこと、少ないウイルス量で同定可能な CODEHOP-snpCR 法と直接塩基配列決定法による検査の信頼性を評価するための EQA 手法について検討した。なお本法でポリオウイルスも検出できることから、EQA による検出感度の確認は意義がある。

## 初年度

ウイルスゲノムを数コピーまで高感度に検出可能な CODEHOP-snpCR 法を用いて手足口病検査を行う場合を想定し、本手法を用いた場合の検査結果について施設間のばらつきを評価する目的で EQA 用試料を検討した。EQA 試料は不活化済み市販 RNA コントロールを想定したが、比較のためウイルス、ウイルス RNA、の条件も検討している。CODEHOP-snpCR 法は定性的にウイルスゲノムを検出する方法であるが、送付方法、濃度、温度環境の諸条件を検討するにあたり、RT-qPCR を併用して、GC 量の変化をモニターしつつ、検討を行うこととした。

市販 RNA を用いた CODEHOP-snpCR 法による検出下限値を調べたところ、メーカー表示換算 99 GC (実測値 70GC) が検出下限値 (感染価にして  $\log_{10} \text{CCID}_{50}$  が 1.5 未満程度) であった。

CODEHOP-snpCR 法で検査を実施する場合、病原体サーベイランスの結果としては血清型の報告を行う。この場合、直接塩基配列決定法によりシーケンス配列を得て、標準株の配列と比較を行い 75% 以上一致した場合、当該血清型とする。

塩基配列解析可能な GC 数は CODEHOP-snpCR 法で検出できる下限値より大きな方が良好な結果を得ることが多く、増幅したバンドが薄い場合、

配列が読めない場合が多いことが知られている。このため検出下限値以下の GC 数では、増幅と配列解析上、再現性にばらつきがあるため、同定目的のルーチン検査では精度管理の対象とするのは現実的ではなく、シーケンス反応が可能な RNA 量、加えて 1 CCID<sub>50</sub> 以上の感染価相当の GC 数を設定した上で、CODEHOP-snpCR 法によりウイルスゲノムを検出できるかどうか(検出感度)、適切に同定できるか(同定の正確性)、について検討すべきである。

なお塩基配列解析により同定可能な GC 数以下の場合、シーケンス反応が成功しなければ、エンテロウイルス同定不能と報告されるが、疫学的な背景など総合的な評価によりポリオを否定することが感染症法上は重要である。

EQA 用 RNA 試料配布にあたり、施設内変動を把握するため FTA Elute カード、RNAstable、の 2 種類を用いて RNA の安定性について温度、濃度など保管条件を検討した。

FTA Elute カードは先行研究で示したように、高濃度でさえ変動が見られ数%の回収率であるが、ウイルス RNA の場合も同様に数%の回収率であり高濃度なら、RNA 試料輸送用に適用可能と考えられる。これに対し、RNAstable の回収率は 1/3 以上であることが分かり、qPCR 用の 100bp 程度の短いフラグメントならば室温でも数日安定であったが、CODEHOP-snpCR 法用には -30 度保管の方が適切と考えられた。

FTA Elute、RNAstable の操作性、回収率などは図 12 に取りまとめた。CODEHOP-snpCR 法用 EQA に市販品 RNA を用いる場合の保管条件について数日の輸送期間ならであれば、-30 度で安定な結果が得られている。

## 2 年次

### 1 .エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

初年度研究により、EQA 試料調製、送付・保管条件を比較検討した結果、市販の RNA コントロー

ルを使用する場合、低濃度に希釈すると再現性がばらつく傾向にあったため、リカバー時に数千 GC/uI になるよう調製することで、エンドポイント用試料として利用可能であった。

2 施設で事前に 3 回繰り返し再現性を確認したが、EQA によりエンドポイント比較のような定量的な試験を実施する場合は、事前に配布用ウイルス RNA の濃度、増幅領域の安定性、再現性について担保する必要性がある。

## 2 . エンドポイント測定

### 1) エンドポイントの設定について

事前に調製した EQA 用 RNA 試料を用いて、12 施設が測定したエンドポイントは、原液から 100 倍希釈 (44 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出可能であり、10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) した試料を検出できた施設が最も多かった。なお 440 GC/uI (メーカー表示換算) の濃度は初年度検討したウイルス感染価 (RD-A 細胞使用) と GC 数の関係で  $\log_{10} \text{CCID}_{50} < 1.5$  未満に相当する (図 3)。経験上、PCR 産物から直接塩基配列を決定する場合、数 ~ 数十 GC ではゲノム RNA の増幅が可能でもシーケンスが読めない場合があるため、再現性の観点から 10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) が増幅できることが、塩基配列による同定を行う場合に望ましい条件であると考えられる。

このように望ましいエンドポイントの濃度に関しては、感染価、ウイルス GC 数、コントロール RNA の希釈倍率の相互関係を事前に検討しておく必要がある。

### 2) CODEHOP-snPCR 法の反応条件

図 7 に示すように 12 施設の反応条件は異なっているにもかかわらず、おおむね 10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) が検出可能であった。各施設では、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA により得られた情報は、ウイルス RNA 検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が情報共有するため

に還元し、検査の質を改善するために活用することが有用であると考えられる。

## 3 . 塩基配列による同定法の比較

### 1) 塩基配列による同定法

VP1 領域を用いた同定の場合、1 施設を除き、標準株の塩基配列との比較、あるいは・並びに RIVM タイピングツール等により、同定を行っていた (表 1)。方法は異なっているが、今回の EQA ではすべて正答を得ている。しかし、ウイルスゲノム塩基配列を用いた相同性検索 (BLAST など) による同定の問題点は病原体検出マニュアルにも記載されているように、同定結果を間違える場合もある。このため、方法論の継続的な周知の必要性が認められた。

### 2) 塩基配列の比較

アライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られ、波形データの確認より 多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた。いずれも標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、塩基配列を用いた同定上は問題がないと判断される。

小児科定点におけるエンテロウイルス病原体サーベイランスはポリオウイルス検査と類似の点が多い。ポリオウイルスの場合、ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) の鑑別時には数個の塩基置換でさえも、波形データと合わせた厳密な確認が必要であり、検査・調査目的に応じた塩基配列の質が求められる (図 13)。

このためエンテロウイルス同定において、報告上の問題がなくとも、同定に用いる塩基配列の波形データは、目視で確認、GAP の確認、アミノ酸置換で確認するなどして質を担保し、必要に応じて機材の保守管理など、2 類感染症であるポリオ検査時の備えとして質を維持してゆく必要がある。

波形のバックグラウンドの高い原因、乱れの原因を特定するための方法の一つとして、EQA 実施時に施設ごとにコントロール試薬 (sequencing standards) を用いた波形解析データとの比較が有効と考えられた。

エンドポイント測定に用いた Sample 1 を 100 倍希釈で検出可能だった A、B 施設は、増幅産物を用いてシーケンスを行ったところ、10 倍希釈 (440 GC/ul : メーカー表示換算) と 100 倍希釈では多型サイトの違いが認められている (図 14)。

今般の EQA により回答を得た塩基配列のアライメントの結果、施設間で多型サイトの出現の有無に差が認められた。ウイルスは mix population のため、鋳型の量、反応系の違いが反映する。手足口病検査に関わるウイルス遺伝子検査の EQA では、施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答は得難いこと、むしろ施設間のアライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を提供すること、が重要であると考えられる。

#### 4 . EQA のパッケージ化

本研究で行った市販 RNA コントロールはウイルスを不活化したフルゲノムであり、商用カタログ上様々な種類のウイルスコントロールが市販されている。やや高価であるが、不活化されていること、フルゲノムであり様々な領域の増幅が可能であること、から今般比較した CODEHOP-snPCR 法以外にも当該 PCR 法にて検出可能な RNA 量を設定することで応用可能である。さらに RNastable により乾燥保存で安定化することで検体輸送が比較的容易になる。

また費用面ではコントロールを適宜希釈することで、国内外の EQA プロバイダが提供する参加費用と原価は同等以下になることが明らかになった。

このため比較的小規模 (十数か所) を対象とした EQA ならば、外部委託などで実施することも可能かもしれない。この場合、配布試料の品質管理

手法 (安定性の条件、確認方法) の開発も考慮しなければならない。

#### E . 結論

1 . 改正感染症法では施設の実情に基づき、検査の質の確保を求めている。類型に基づき、整備すべき検査標準作業書 (SOP) などの技術文書の種類は異なる。信頼性確保の在り方についても、蔓延防止の観点から危機管理対応が必要な 2 類など感染症検査と国民に情報提供を行う 5 類定点把握疾患では、求める精度管理の目的は異なると考えられる。

即ち 2 類感染症であるポリオの確定診断、あるいは退院時の感染の有無の検査には高感度かつ正確性が求められるとしても、流行状況について情報提供を目的とする手足口病、ヘルパンギーナなどのウイルス検査の検出感度、同定に必要な遺伝子解析の精度は、地方衛生研究所・地方自治体が積極的疫学調査で実施する目的により判断することになる。

ポリオ検査に対応した検出感度、正確性を維持するためにはルーチンの病原体サーベイランスを通じて一定の精度を確保することが望まれる。

このため EQA による比較調査の結果は、施設間で情報共有を行い、施設内では機材保守管理、内部精度管理によるルーチン検査の質の維持、そして改善に向けた PDCA を動かすメカニズム (技術マネジメント研修等) を構築することが重要である。

2 . EQA で評価するウイルス検出感度の差については、各施設で、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA を通じて、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が改善に向けて活用することが望まれる。 また調査結果を地方衛生研究所間で共有すべきである。

3 . EQA による遺伝子検査結果の評価は施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答は得難いこと、むしろ施設間塩基配列の

アライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を還元すること、が重要である。

4. 本研究では市販の非感染性試料を用いて EQA をパッケージ化し他の疾患にも応用可能であることを示した。5 類定点把握疾患の病原体サーベイランスに関しては、積極的疫学調査で行っていることを踏まえ、EQA の実施主体は予算の担保を前提に民間委託、レファレンスセンターの活用も検討すべきかもしれない。この場合は配布試料の品質管理手法（安定性の条件、確認方法）の開発も十分考慮すべきである。

5. 手足口病、ヘルパンギーナの検査は咽頭ぬぐい液の検体提出が多い実情を踏まえ、医療機関による採取時期等、保管条件など検査以外の要因もサーベイランス実施上考慮する必要がある。即ち病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 板持雅恵, 滝澤剛則, 伊東愛梨, 三浦美穂, 伊藤雅, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 後藤明子, 島あかり, 下野尚悦, 高橋雅輝, 筒井理華, 中田恵子, 中野守, 西澤佳奈子, 濱崎光宏, 吉富秀亮, 堀田千恵美, 松岡保博, 三好龍也, 吉田弘: 平成 27 年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて 病原体検出情報 37(10):208-209, 2016.

2) Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Sci. Rep. 6, 31474, 2016.

3) 濱崎光宏, 吉田弘: エンテロウイルスのウイルス学的検査診断 小児科 57, 949-956, 2016.

4) 吉田弘, 環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見 東京小児科医会報 36(1): 26-30, 2017

5) 吉田弘, 高橋雅輝, 濱崎光宏, 山下育孝, 四宮博人, 山下照夫, 皆川洋子, 岸本剛, 調恒明 エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原体検出情報 38(10): 199-200, 2017.

### 2. 学会発表

1) 吉田弘: 環境水ウイルスサーベイランスとは 第 57 回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー 平成 28 年 6 月 19 日 郡山市

2) 吉田弘: 感染症法改正にかかわる病原体サーベイランスと信頼性確保について 平成 28 年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域専門家会議 平成 28 年 10 月 20 - 21 日 佐賀市

3) 吉田弘: 改正感染症法における検査標準作業書と精度管理のあり方について 平成 29 年度地域保健総合推進事業 地全協関東甲信静支部レファレンスセンター連絡会議 平成 29 年 10 月 11 日 千葉市

4) 吉田弘: 改正感染症法における標準作業書と検査の信頼性確保について 平成 29 年度 地域保健総合推進事業 地全協九州支部レファレンスセンター連絡会議 平成 29 年 10 月 24 日 熊本市

5) 吉田弘: 改正感染症法における検査標準作業書の精度管理の在り方について 平成 29 年度地域保健総合推進事業 地全協中国四国支部レファレンスセンター連絡会議 平成 29 年 11 月 8 日 岡山市

6) 吉田弘: 改正感染症法における病原体検査の信頼性確保について 平成 29 年度地域保健総合推進事業 地全協東海北陸支部レファレンスセンター連絡会議 平成 29 年 11 月 10 日 名古屋市

7) 帖佐徹, 吉田弘, 滝澤剛則: 環境水サーベイランス手法の中国への導入について 第 76 回日

本公衆衛生学会平成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 鹿児島市

8) 吉田弘、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、滝澤剛則、中田恵子、世良暢之、濱崎光宏：環境水サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題 第 76 回日本公衆衛生学会 平成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 鹿児島市

9) 濱崎光宏、世良暢之、吉田弘：環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業の患者数との関連について 第 76 回日本公衆衛生学会平成 29 年 10 月 31 日-11 月 2 日 鹿児島市

10) 帖佐徹、吉田弘、板持雅恵、滝澤剛則、Zhang Yong, Xiaohui Hou, Zheng Huanying, Wang Haiyang, Tao Zexin : Collaboration study of environmental surveillance for polio since 2005 between Japan and China グローバルヘルス合同大会 2017 平成 29 年 11 月 24-26 日 東京

## H. 知的所有権の出願・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

### (参照文献)

- 1) 平成 25 年度厚生労働科学研究「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」(宮崎班) 分担報告書
- 2) Nix WA. et.al: J Clin Microbiol 44(8): 2698-2704 .2006.
- 3) Nijhuis M. et.al: J Clin Microbiol 40: 3666-3670 .2002.
- 4) Li Y. et.al. :J Virol Methods 186:62-67,2012.

図1 配布試料の調製条件

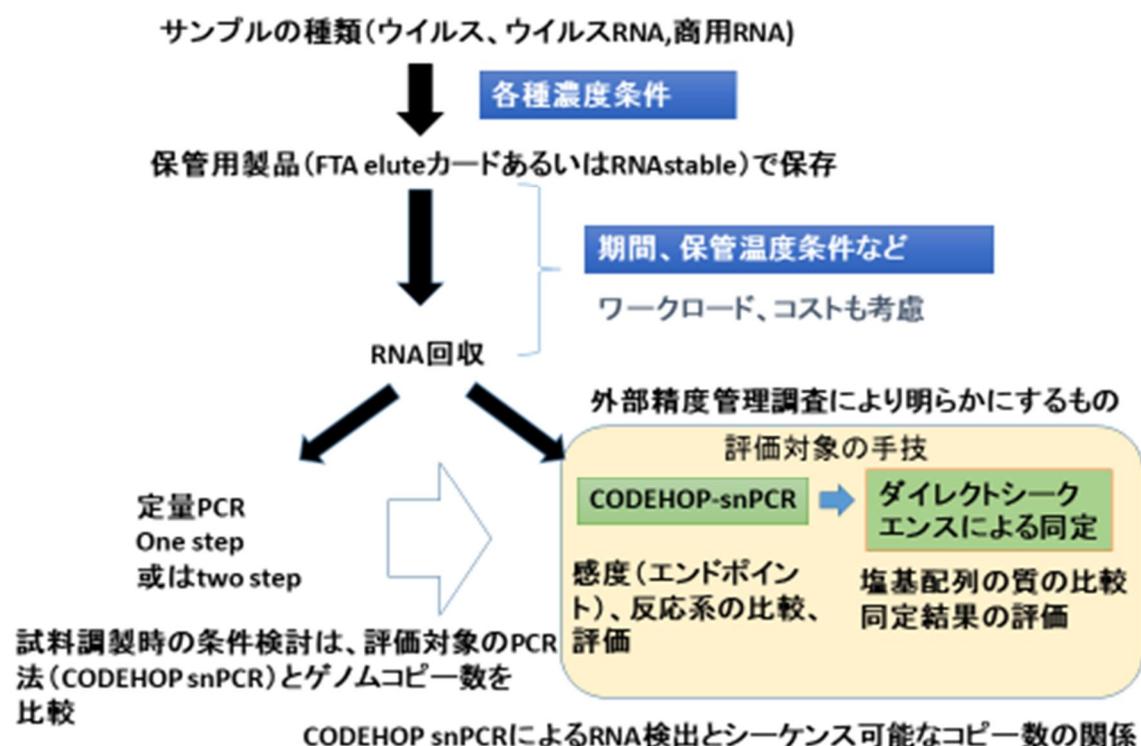


図2 手足口病EQA試料の作成

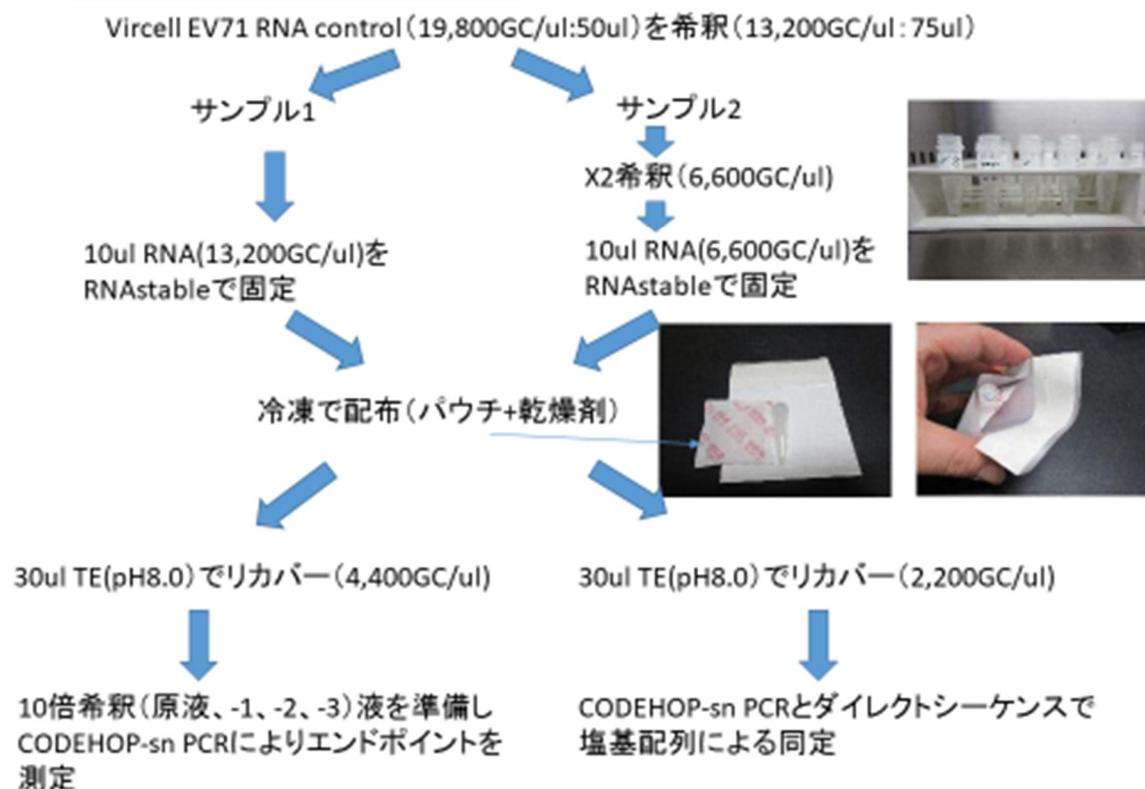


図3

ウイルス力価と検出系について

ウイルス希釈	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
Virus titer (-logCCID50 /50ul)	6.5	(5.5) 相当	(4.5)	(3.5)	(2.5)	(1.5)	(0.5)	(-0.5)	(-1.5)
vRNA (GC/ul)	ND	ND	6.8E +05	6.4E +04	5.6E +03	6.4E +02	6.0E +01	6.8E +00	不検出
CODEHOP- snPCR	ND	ND	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
Vircell RNA希釈液(理論値 2.0E+04/ul)					10 <sup>-1</sup> ND	10 <sup>-2</sup> 1.4E (7.0E +02 +01)	10 <sup>-3</sup> (3.5E +01)	10 <sup>-4</sup> 4.4E 1.5E +00 +00)	
CODEHOP-snPCR					++++	+++	+++	+/-	-

シーケンス反応の下限10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup> GC/ul

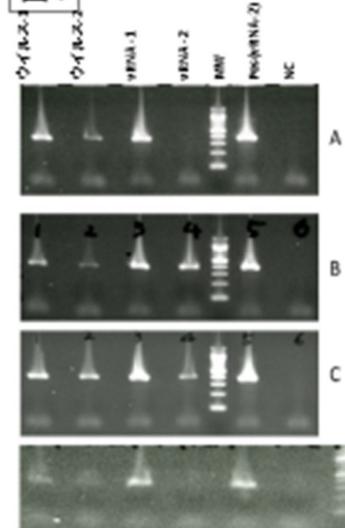
CODEHOP-snPCRの検出限界

CODEHOPの評価なら  
数千以上のGCが検出できること  
を目安としてはどうか

ウイルスゲノムは検出できても  
シーケンスは不可→遺伝子による同定  
は不可(エンテロNTとして報告)

エンテロNTは感染価を含めポリオ否定が重要  
(個票を含め総合的な判断が必要)

図4



FTAelute 回収結果(4人で実施)

FTAeluteカードから回収したRNAのCODEHOP PCRの結果  
(固定1日後、4度保管の条件)

	Virus (6.5CCID50)		vRNA		Pos vRNA	NC
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	
A	++++	++	++++	-	++++	-
B	++++	++	++++	++++	++++	-
C	++++	++++	++++	++	++++	-
D	++++	++	++++	-	++++	-

ウイルスの方が比較的安定。-2のvRNAを回収時、不安定

回収したウイルス、ウイルスゲノムのコピー数(GC/ul)

コントロール のGC/ul	Virus		vRNA			
	-1	-2	-1	Recovery (%)	-2	Recovery (%)
vRNA						
copy/ ul	2.3E +06	1.8E +05	1.3E+04	4.0E+02	6.3E+03	1.1E+03
Ct	18.4	22.1	8.7E+03	1.2E+05	undetect	undetect

\*CODEHOPによる検出では強いバンド

図5

## RNA stableを用いたRNA安定性の確認

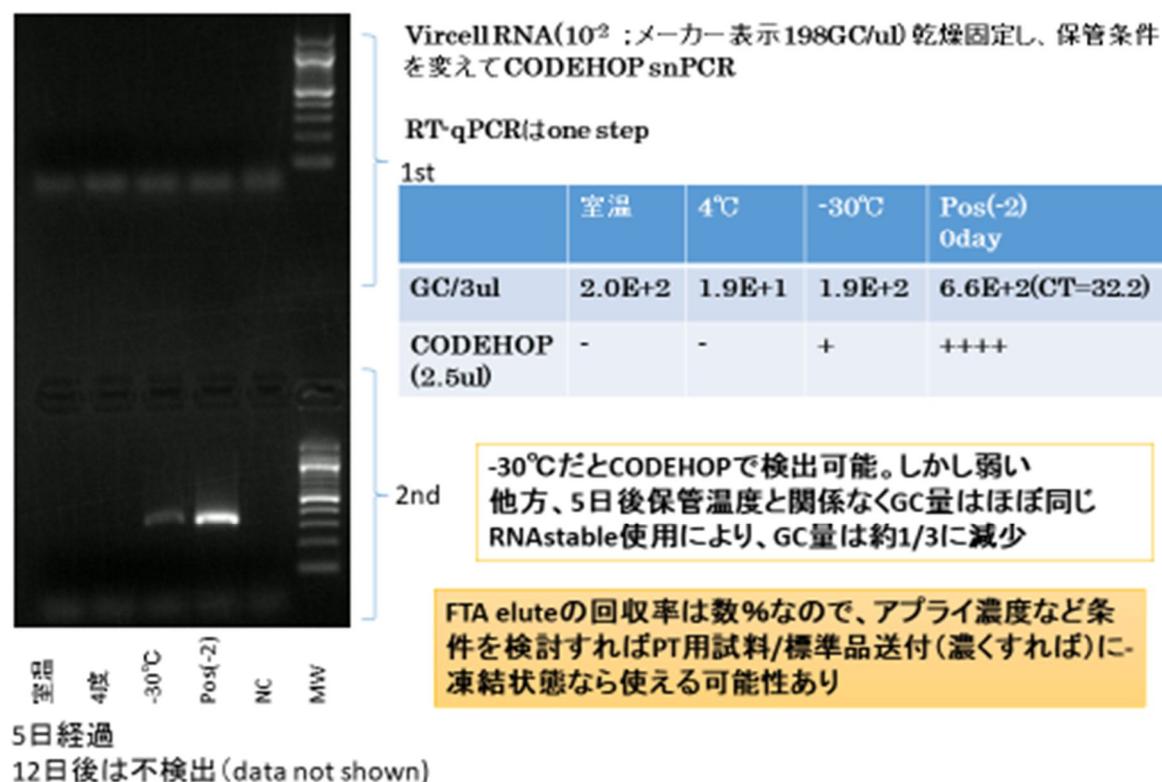
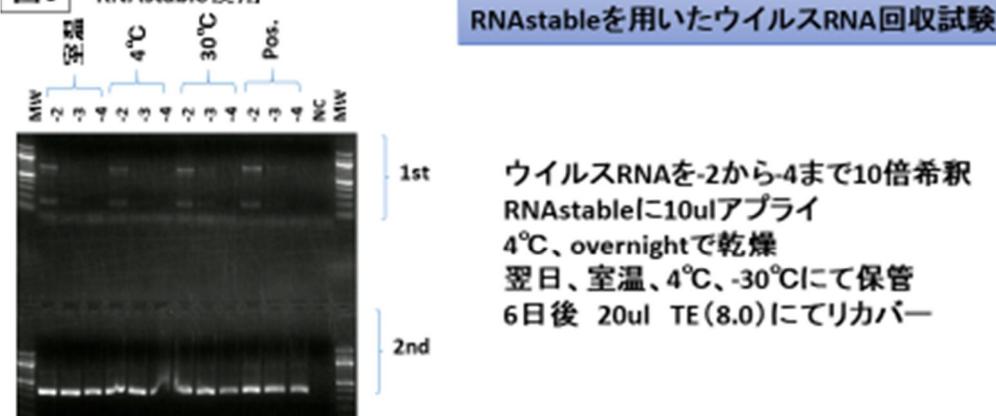


図6

## RNAstable使用



希釈したウイルスRNAと保管温度の関係 (GC/ul)

Virus dilution(x10)	control			RNA stable (6days)		
	vRNA	Ct	1/2vRNA	RT	4°C	-30°C
-2	3.0E+05	21.0	1.5E+05	1.4E+05	1.5E+05	1.3E+05
-3	1.6E+04	25.3	0.8E+04	1.4E+04	1.5E+04	1.3E+04
-4	2.8E+03	27.7	1.4E+03	1.3E+03	1.4E+03	1.4E+03

10ulアプライし、20ulでリカバーするといずれの温度環境下でも6日後は、非常に安定していた (CODEHOPの結果、コピー数とも)

GC量が $10^3$ 以上なら安定する模様

図7

CODEHOP-snPCRによるRNA検出エンドポイント比較

- あらかじめ約4,400GC/ulに調製したRNAコントロールを10<sup>-1</sup>から10<sup>-3</sup>まで希釈列を作成しエンドポイントを測定。
- 測定回数は任意

結果

- 測定は1回~4回( ) 1か所は4回、2か所は3回、9か所は1回測定
- 12か所の施設間で下記のような検出感度に差が見られた。
- 5/12施設のエンドポイントは10倍希釈まで検出可能であった。



図8 反応系の違い(同じ酵素は同一の色で示す) **オリジナルの系(I,J)**

RT	反応条件				1st PCR				Ramp 60°C以上は Ramp 0.4°C/sec	cycle 数	2nd PCR				cycle 数
	RNA量 (u0)	酵素	pre	d	a	e	pre	d			a	e	pre	d	
A	20	100	42 15 x m	10 oo	25	5	95-188-142-3 m	72-5 18 oo	40	25	1	95-188-168-372-1 m	72-5 18 oo	40	
B	20	100	37 15 x m	4:oo	25	5	95-595-342-358-45 m	72-5 18 oo	40	50	1	95-695-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
C	10	50	22 45495-5 15 x m	4:oo	25	5	95-284-342-358-45 m	72-5 18 oo	40	25	2	95-284-258-272-1 m	72-5 18 oo	40	
D	10	50	22 42695-5 19 m	4:oo	25	5	94-185-342-358-45 m	72-5 18 oo	40	25	0.5	94-185-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
E	25	12.50	22 42695-5 19 m	4:oo	25	2.5	94-284-342-372-45 m	72-5 18 oo	40	25	2.5	94-284-268-372-3872-5 m	72-5 18 oo	40	
F	15	50	55478-1 5m 5m	4:oo	25	5	95-595-342-372-45 m	72-5 18 oo	35	25	1	95-595-268-372-3872-5 m	72-5 18 oo	35	
G	10	50	59 41695-5 1m 8m m	4:oo	50	10	94-342-372-45 m	72-5 18 oo	40	20	10	94-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
H	20	100	37 15 x m	4:oo	25	5	95-342-358-45 m	72-5 18 oo	40	25	1	95-695-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
I	10	50	22 42695-5 19 m	4:oo	50	10	95-342-358-45 m	72-5 18 oo	40	50	1	95-695-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
J	10	50	22 42695-5 19 m	4:oo	50	10	95-342-358-45 m	72-5 18 oo	35	50	1	95-695-268-272-15 m	72-5 18 oo	35	
K	5	2.50	22 42695-5 19 m	4:oo	25	5	95-595-342-372-45 m	72-5 18 oo	40	25	1	95-695-268-272-15 m	72-5 18 oo	40	
L	15	50	55478-1 5m 5m	4:oo	24	4	95-595-342-372-45 m	72-5 18 oo	35	24	4	95-595-268-372-3872-5 m	72-5 18 oo	35	

①PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara)  
 ②SuperScript III (000 U/A)  
 ③SuperScript II (500 U/A)  
 ④MMLV Reverse Transcriptase XL (500 U x 1本) (TOYOBO)

⑤Takara Taq Hot Start Version (SU/A) (Takara, PR007A)  
 ⑥Takara Ex-Taq Hot Start Version (SU/A) (Takara, PR006A)  
 ⑦Taq DNA Polymerase, SU/A (シグマ)  
 ⑧General Amp PCR Master Mix (Takara)  
 ⑨General Amp MAX PCR Master Mix

⑩Prime Ex-Taq Hot Start version (SU/A) (Takara)  
 ⑪FastStart Taq DNA Polymerase, SU/A (シグマ)

表1 塩基配列によるエンテロウイルス同定法の回答(12施設)

同定法	施設数
標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)	7
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成、BLAST検索	1
BLAST検索で相同性が高い株で判断	1

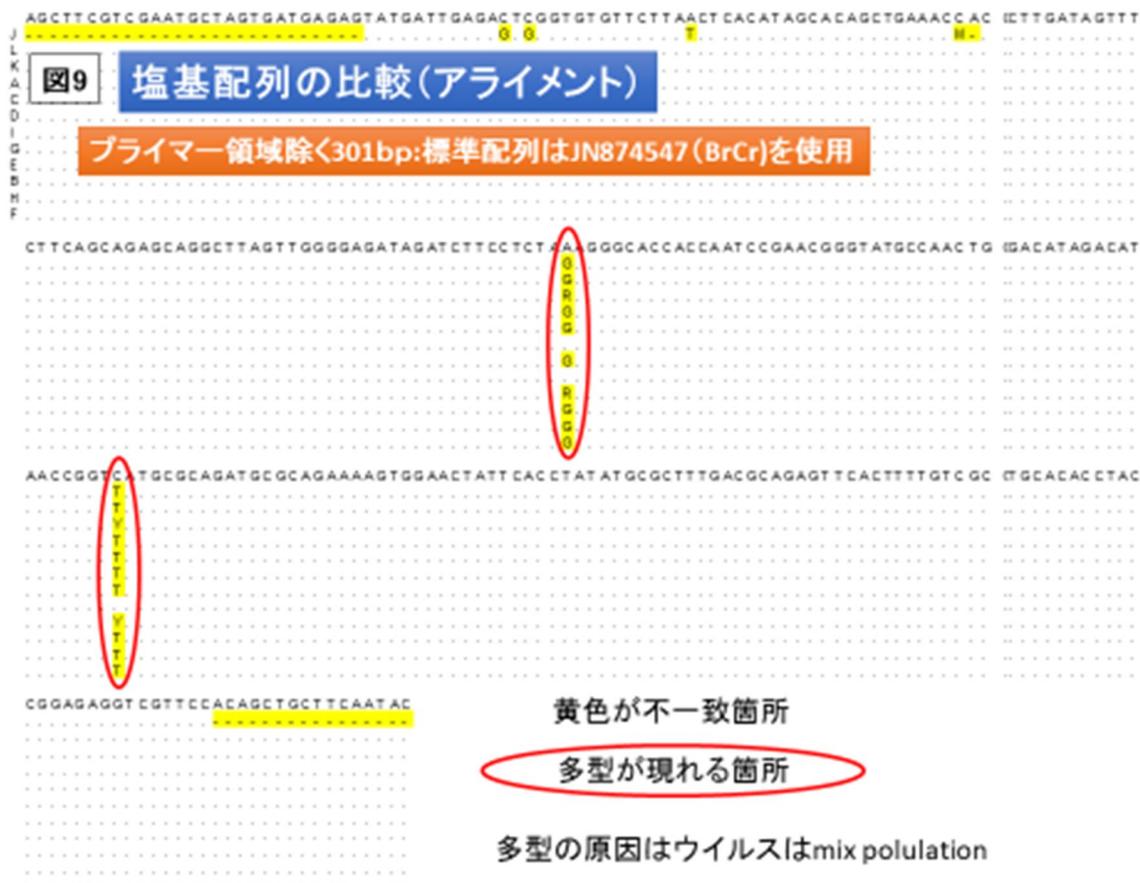


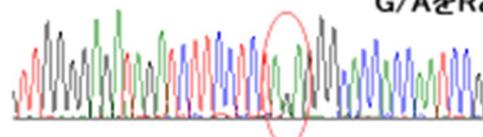
図10 波形データ

多型が見られるサイトの報告例

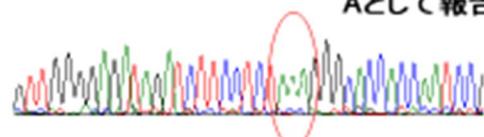
④多型が見られないケース

①多型として報告しているケース

G/AをRとして報告



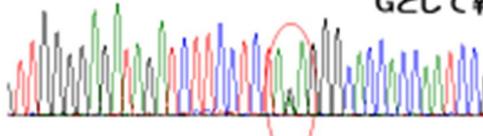
Aとして報告



②シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース

TTGGGGAGATAGATCTTCTCTAGAGGGCCACCAATCCG

Gとして報告



波形データの比較より

同一部位になぜ多型が現れるか？

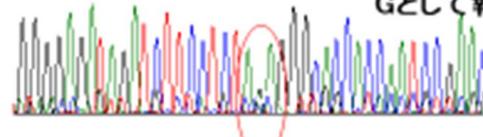
→ウイルスはMix population であることに留意

シーケンスコントロール (Sequencing standards) と比較することでバックグラウンドが高い原因と特定することも考慮

③バックグラウンドが高く判定困難

TTGGGGAGATAGATCTTCTCTAGAGGGCCACCAATCCGAAAC

Gとして報告



同定には影響がなくとも、1塩基置換が重大な結果に反映することを留意

反応系、機器のコンディション等、原因の特定と改善を検討する

図11

12か所(予備2セット)のEQAコスト(エンドポイント測定+塩基配列による同定)

RNAstable

Biomatrix社製

(25チューブ入り @39,000円)

1560円/本x2種類=3120

3,120

RNA陽性コントロール

Vircell社製(19800GC/ul:50ul @78,000円)

234000/14

3本使用(78,000x3=234,000)し、2種類14セット作成可能

=16714

エンドポイント測定用 10ulx14=140ul

シーケンス用(x2希釈) 5ulx14=70ul (+70ul DW)

16,714

輸送費(冷凍)

12か所=17472 1か所平均

1,456

2種類送付(1か所あたりのコスト)\* 21,290

\*希釈率を変えることによりコスト削減は可能—10か所を想定

例) 19800GC/ul:50ul → 100ulでリカバー(9900GC/ul)

RNAstable使用(10本) → 3300GC/ul(原液)

エンドポイント測定用試料をシーケンスにも兼用するなら1か所10000円程度

図12

検体保管・輸送に用いる各種製品の評価のサマリー

	RNA固定	RNA回収	回収率	価格	温度安定性
FTA elute card (40ul)	容易 3hrs	容易 (数十分)	ばらつく (高濃度に すること)	450円 (40ulx4サークル:1サークル)	数日なら室温OK
FTA カード (125ul)	容易 1hrs	抽出キット 要。煩雑	Not done	555円/枚 (125ulx1サークル)	Not done
RNastable (10-20ul)	容易 Over night	容易 (15 分)	安定	1560円 (チューブ)	市販RNAは乾燥状態なら凍結すれば非常に安定 (短い領域を用いるqPCR用なら室温でも1週間以上安定)

図13

エンテロウイルス塩基配列に求められる質について

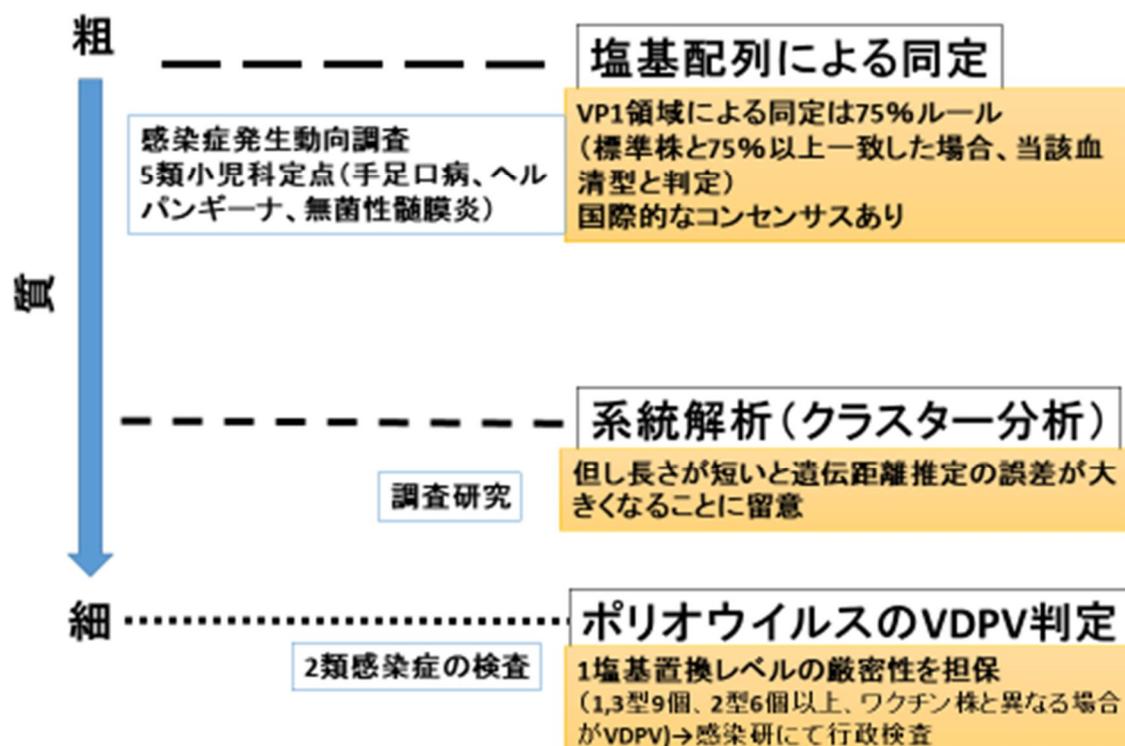
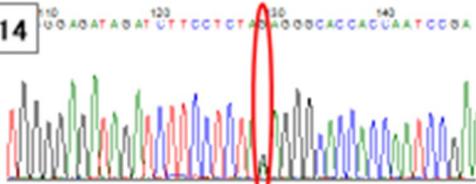
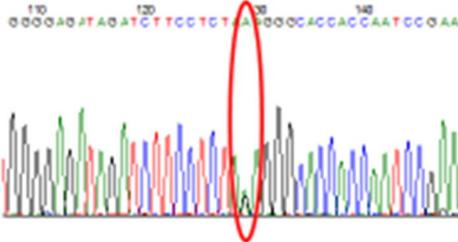


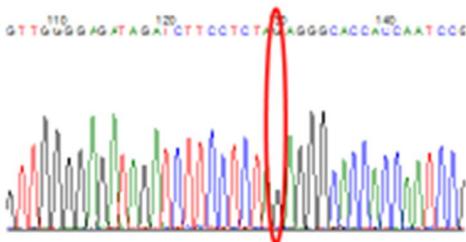
図14



Sample 2 (2,200GC/u)を増幅



Sample 1を10-1希釈(440GC/u)で増幅



Sample 1を10-2希釈(44GC/u)で増幅

試料の濃度が塩基配列解析に与える影響

B施設の例

G>A  
(R)

サンプル1,2は同じ試料  
サンプル1 約4,400GC/u  
サンプル2 約2,200GC/u

A>G  
(R)

濃度による違いでG/A→G



ウイルスはmix populationである

G

A施設はいずれの濃度も多型  
は出現せず  
2200GC (G), 440GC (G), 44GC (A)

## 手足口病検査に関わる外部精度管理調査試行のための条件検討

### 1.概要

- エンテロウイルス検査で普及している CODEHOP-snPCR 法の 感度比較、 遺伝子同定に用いる塩基配列の比較調査
- 参加施設は10カ所程度を予定
- 報告期限は到着後3週間以内(12月25日頃を目安)でお願いします
- 本報告による分析結果は皆川班の報告書に参加衛研名を匿名にして使用します

### 2.目的

#### ア.エンドポイント測定

原著では CODEHOP 法は数 GC まで検出可能。国内では様々な酵素系を用いており、これまで反応系の違いによる横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いてエンドポイントの比較調査を行う。

#### イ. 塩基配列による同定法の比較

病原体サーベイランスの手足口病はエンテロウイルスの血清型を報告。標準株の塩基配列と比較する同定法が普及しているが、用いる配列の比較調査もこれまでなされたことはない。のように酵素系も異なっているため、比較を行う。

### 3.準備

#### 1) 外部精度管理調査用配布品の概要

用いた市販 RNA コントロール

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul)

RNA 保管用試薬

RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)

TE buffer (pH8.0)

以上を吉田が調製し以下配布

配布品は3種類

Sample 1:エンドポイント比較用試料 (TE 30ul でリカバーすると約 4400GC/ul) 1本

Sample 2: 塩基配列による同定用試料 (TE 30ul でリカバーすると約 2200GC/ul) 1本

TE buffer (pH=8.0) 分注品 1本

配布方法は冷凍(宅急便、ドライアイスなし)

#### 2) サンプルの準備方法

チューブに添付した TE buffer 30ul を加え試料をリカバー  
(受領後、すぐに検査を行わなければリカバーせず-80度保管)

試料はチューブの底に黄色に着色し乾燥状態。

TE buffer 30ul を入れ 15 分放置 (室温)

穏やかに数回ピペティングし溶解\*(粘性あり)。

\*Buffer を入れ、溶解するとピンクに着色する。

#### 4.比較調査の方法

##### ア. エンドポイント測定

1) 方法と報告内容

- サンプルを上記に従い準備
- 10 倍希釈列 (10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-3</sup> まで) を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて CODEHOP-snPCR を実施し、エンドポイントを確認 (原液、-1、-2、-3)
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイントとともに報告 (以下、例)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
サンプル	++++	+++	+/-	-	-

写真も添付 (マーカーの濃度とアプライ量も)

2) エンドポイント測定結果

(繰り返した場合は、その結果も示していただくようお願いします。)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
Sample 1					

電気泳動写真

マーカーの濃度、サンプルアプライ量

3) 比較に必要な情報(以下は例、貴研究所で実施している内容に適宜変更ください。マニュアルの写し添付でも結構です)

PCR 使用機器名:

例) ABI GeneAmp9700

2) 反応系(cDNA,PCR1,PCR2の酵素、容量など下記の例を参考)

cDNA 作成

以下例

SuperScript II (200 U/ul) (サーモフィッシャー)使用

		反応系 5 $\mu$ l
EV VP1 cDNA (RT) kit	1.5	
0.1 M DTT	0.5	
RNase Inhibitor (40U/ul)	0.25	
SuperScript II (200 U/ul)	0.25	
		Total <u>2.5 <math>\mu</math>l</u> + vRNA <u>2.5 <math>\mu</math>l</u>

22

10min

42	60min
95	5min
4	hold

1st PCR  
(以下例)

Taq DNA Polymerase ( 5U/ul, )( Roche ) 使用

反応 25  $\mu$ l

*Enterovirus VP1 PCR 1KIT	15
DW +_Taq DNA Polymerase (5U/ul)	5

Total 20  $\mu$ l

+ cDNA 5  $\mu$ l

95	30sec	
42	30sec	
60	45sec	35 cycle
4		

2nd PCR

反応 25  $\mu$ l

*Enterovirus VP1 PCR 2 KIT	19.5
DW+FS Taq ( 5U/ul)*	5

Total 24.5  $\mu$ l + 1st PCR 反応物 0.5  $\mu$ l

95	6min	
95	30sec	
60	20sec	
72	15sec	35 cycle
4		

\* 感染研の CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定のとおり作成

RNA のアプライ量 2.5  $\mu$ l

ゲルの濃度 2.0% agarose gel

PCR 産物のアプライ量 5  $\mu$ l

マーカーの種類と濃度 100bp DNA Ladder Markers (Genetics) 100  $\mu$ g/ml

アプライ量 5  $\mu$ l (約 100ng/ $\mu$ l)

**イ. 塩基配列による同定法の比較**

1) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30ul TE で、Sample 1 と同様リカバー
- CODEHOP-snPCR 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で PCR 産物を精製し、塩基配列解析

2) 結果の報告

	同定結果	同定法 (RIVM の EV タイピングツールの使用、標準株との比較、など)
Sample 2		

- 同定に用いた編集済み塩基配列データ (FASTA 形式で添付かメールにテキストでお願いします)
- ABI ファイル (センスとアンチセンス側をメールに添付し送付ください)