

令和7年度 外部精度管理事業
課題2 麻しん・風しんウイルスの遺伝子解析
実施手順書

- 1) 検体は麻しんウイルス RNA 及び風しんウイルス RNA 各1点（合計2点）です。各ウイルス RNA は RNA 安定剤と混合させた後に乾燥させており、チューブ底面に乾燥した RNA が存在しますので以下の手順で溶解してください。検体は溶解の有無にかかわらず、到着後は-70°C 以下にて保管してください。
- 2) 各チューブのスピンダウンを行ってから 200 μ L の Nuclease-free water を加え、室温で 10 分間静置してください（氷上には置かないでください。底面に気泡が存在する場合はスピンダウンで気泡を除去してください）。その後、30 秒間のボルテックス、続いて 10 回の転倒混和（チューブ内の溶液が完全に上下移動するように、確実にシェイクする）を行い、底面に固形物が残っておらず、均一に混合されたことを確認してください。溶解後の検体を「遺伝子検出検査でそれぞれ麻しんウイルス・風しんウイルスの遺伝子が陽性であった RNA 検体（RNA 抽出済み）」として取り扱い、各参加施設の方法に従ってウイルス遺伝子配列の解析及び遺伝子型の決定を行ってください。
- 3) 検査終了後、本手順書 2 ページ以降の内容（検査結果入力項目、アンケート項目）を外部精度管理事業結果入力専用 WEB サイトに入力してください。また、補助データ（RT-PCR 産物の電気泳動像、シーケンス波形データならびに系統樹データ）についても同一 WEB サイトからアップロードしてください。
- 4) 評価対象となる項目は、麻しん及び風しんの遺伝子型・塩基配列（系統樹解析/遺伝子型決定に使用した領域の塩基配列）です。
- 5) 結果登録締切日（検体発送後約 3 週間、日付は検体発送時に通知、ホームページにも発表予定）までに結果の入力を完了し、必ず「確定」してください。期日前であれば「確定」していても修正可能ですが「確定」していないと登録とみなされません。
*結果入力の確定が上記の締切日時に間に合わないが見込まれる場合は、事前に事務局に連絡をお願いします。連絡無しに検査結果が未確定や未入力の場合、参加辞退として処理されますのでご注意ください。
- 6) 結果入力の正確性も評価対象です。結果の記入漏れ・検体記号の誤記などがあった場合は正解になりませんので、ご注意ください。
- 7) 使用後の検体は臨床検体に準じて廃棄してください。

ご不明な点やトラブルなどがありましたら、下記にお問い合わせください。

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 外部精度管理事業事務局

TEL 03-5285-1111（内線 2301）

E-mail eqa@nih.go.jp

検査結果入力項目

1. 麻しんウイルス解析（評価対象項目は 1）～3））

1) 検体記号（半角大文字 M と数字 4 桁）： _____

2) 遺伝子型（以下の 25 項目より選択）

（A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, E, F, G1, G2, G3, H1, H2, 決定できず）

注：決定できなかった場合には、どこの段階でうまくいかなかったか「7) 備考」にご記載ください。

3) 塩基配列（系統樹解析/遺伝子型決定に使用した領域の塩基配列を入力してください）

注：一部配列が解析できなかった場合も解析できた範囲で配列を入力してください。混合塩基の場合は IUPAC の定める表記（例：G or A は R と表記）で記載してください。

4) 遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR の方法（以下の 3 項目より選択）

- ・病原体検出マニュアル
- ・病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）
- ・その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

5) シークエンス反応の方法（以下の 3 項目より選択）

- ・病原体検出マニュアル
- ・病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）
- ・その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

6) 麻しんウイルス株名（自由記載）

以下の情報を元に WHO が定める方法（病原体検出マニュアル参照のこと）で命名してください：

貴所管轄地域内で 2025 年 2 月 9 日に発疹が出現した患者から採取された臨床検体から RT-PCR でウイルス遺伝子が検出された。同一週に検出されたウイルスとしては 1 番目である。

7) 備考（自由記載）

2. 風しんウイルス解析（評価対象項目は 1）～3））

1) 検体記号（半角大文字 R と数字 4 桁）： _____

2) 遺伝子型（以下の 14 項目より選択）

（1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 2A, 2B, 2C, 決定できず）

注：決定できなかった場合には、どこの段階でうまくいかなかったか「7) 備考」にご記載ください。

3) 塩基配列（系統樹解析/遺伝子型決定に使用した領域の塩基配列を入力してください）

注：一部配列が解析できなかった場合も解析できた範囲で配列を入力してください。混合塩基の場合は IUPAC の定める表記（例：G or A は R と表記）で記載してください。

4) 遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR の方法（以下の 3 項目より選択）

- ・病原体検出マニュアル
- ・病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）
- ・その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

5) シークエンス反応の方法（以下の 3 項目より選択）

- ・病原体検出マニュアル
- ・病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）
- ・その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

6) 風しんウイルス株名（自由記載）

以下の情報を元に WHO が定める方法（病原体検出マニュアル参照のこと）で命名してください：

貴所管轄地域内で 2025 年 4 月 14 日に発疹が出現した患者から採取された臨床検体からウイルス分離を行った。分離されたウイルスの遺伝子解析を行った。同一週に検出されたウイルスとしては 2 番目である。

7) 備考（自由記載）

補助データの登録

入力データの確認のため、以下の情報について登録してください。

1) RT-PCR 産物の電気泳動図

以下の「泳動図 Powerpoint ファイル作成要領」を参考にして作成したファイルをアップロードしてください。

2) シーケンス波形データ

配列決定に用いた波形データを麻しん／風しん前半断片／風しん後半断片、フォワードプライマー／リバースプライマー／補助プライマー別にアップロードしてください。ab1 もしくは scf 形式でアップロードしてください。入力項目に該当しない場合やファイル形式が異なる場合には事務局にご相談ください。

<入力フィールド>

麻しん フォワードプライマー

麻しん リバースプライマー

風しん前半断片 フォワードプライマー

風しん前半断片 リバースプライマー

風しん後半断片 フォワードプライマー

風しん後半断片 リバースプライマー

風しん後半断片 補助プライマー（使用した場合のみ）

3) 遺伝子型決定に用いた系統樹図

pdf または Powerpoint ファイルでアップロードしてください。

泳動図 Powerpoint ファイル作成要領

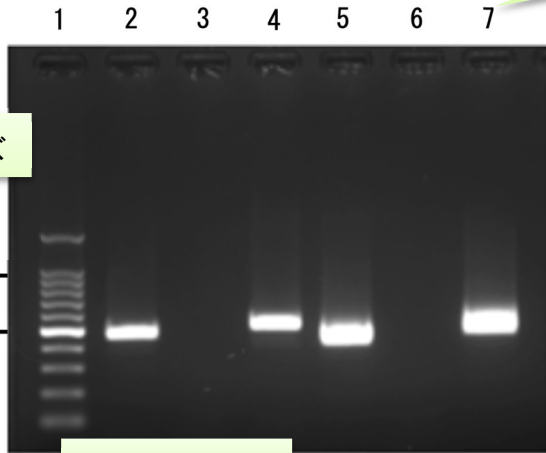
1. 外部精度管理事業専用 WEB サイト「結果入力サイト」から泳動図例 Powerpoint ファイル (R7_eqa_MR_EP.pptx) をダウンロードしてください。
2. 麻しん検査と風しん検査でそれぞれ 1 枚のスライドページを作成し、1 つのファイルにまとめてください。
3. 後述の記載例に従って、電気泳動写真画像を貼り付け、説明を追加してください。
4. 作成したファイルを保存し、結果入力専用 WEB サイトにて、ファイルをアップロードしてください。

施設名

麻疹ウイルスまたは風疹ウイルス

国立感染症研究所 風疹ウイルス遺伝子型決定領域増幅RT-PCR産物 泳動図 (例)

レーン番号



マーカサイズ

アガロース濃度 (1.5% Agarose)

各レーンの説明

1. 100 base ラダーマーカー
2. 麻疹検体_E1-(2)
3. ネガティブコントロール_E1-(2)
4. ポジティブコントロール_E1-(2)
5. 麻疹検体_E1-(3)
6. ネガティブコントロール_E1-(3)
7. ポジティブコントロール_E1-(3)

2, 3, 4は、病原体検出マニュアル記載のE1-(2)断片増幅RT-PCR産物である。
5, 6, 7は、病原体検出マニュアル記載のE1-(3)断片増幅RT-PCR産物である。
いずれもRT-nested PCR産物を電気泳動した。

特記事項

報告事項があれば、こちらに記載してください

用いた RT-PCR 法について、1st PCR もしくは Nested PCR の産物のどちらを泳動したか等を簡単にご説明ください。

アンケート調査項目 以下の回答はトラブルシューティングに活用されます。

麻しん

■ 遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR

用いた試薬を選択してください。

注：逆転写反応と PCR を一回の反応で行う試薬の場合は、<RT 試薬>から選択してください。その場合、<1st PCR 試薬>では<非該当>を選択してください。Nested PCR を実施しなかった場合には<非該当>を選択してください。

- ・ RT 試薬（15 選択肢から選択）
 - PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)
 - PrimeScript Reverse Transcriptase
 - PrimeScript II Reverse Transcriptase
 - Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR
 - SuperScript II Reverse Transcriptase
 - SuperScript III Reverse Transcriptase
 - SuperScript IV Reverse Transcriptase
 - ReverTra Ace qPCR RT
 - ReverTra Ace - α -
 - QIAGEN OneStep RT-PCR Kit
 - PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2
 - PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit
 - SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase
 - SuperScript IV One-Step RT-PCR
 - その他（特記事項に記載）
 - 特記事項（自由記載）
- ・ 1st PCR 試薬名（16 選択肢から選択）
 - PerfectShot Ex Taq
 - Tks Gflex DNA Polymerase
 - TaKaRa Ex Taq Hot start version
 - TaKaRa Ex Taq
 - EmeraldAmp PCR master mix
 - PrimeSTAR GXL DNA Polymerase
 - PrimeSTAR Max DNA Polymerase
 - AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase
 - AmpliTaq Gold DNA polymerase
 - Platinum II Taq DNA polymerase
 - Platinum SuperFi DNA Polymerase
 - KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
 - KOD -Plus- Neo
 - KOD FX Neo
 - 非該当
 - その他（特記事項に記載）
 - 特記事項（自由記載）
- ・ Nested PCR 試薬名（16 選択肢から選択）
 - PerfectShot Ex Taq
 - Tks Gflex DNA Polymerase
 - TaKaRa Ex Taq Hot start version
 - TaKaRa Ex Taq
 - EmeraldAmp PCR master mix
 - PrimeSTAR GXL DNA Polymerase
 - PrimeSTAR Max DNA Polymerase
 - AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase
Platinum II Taq DNA polymerase
Platinum SuperFi DNA Polymerase
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
KOD -Plus- Neo
KOD FX Neo
非該当
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ PCR 産物の精製

・方法（3 選択肢から選択）

溶液から直接精製
ゲルからの切り出し精製
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

・試薬（10 選択肢から選択）

QIAquick PCR Purification kit
QIAquick Gel Extraction kit
MinElute PCR Purification kit
MinElute Gel Extraction kit
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system
ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up
PureLink PCR Purification kit
PureLink Quick Gel Extraction kit
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ シーケンス反応

・試薬（5 選択肢から選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit
DTCS Quick Start kit
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ シーケンス反応産物の精製（ダイターミネーター除去）

・試薬または方法（9 選択肢から選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye XTerminator
Centri-Sep
AutoSeq G-50
Gel Filtration Cartridge
CleanSEQ
NucleoSEQ
エタノール沈殿
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ 遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR

用いた試薬を選択してください。

注：逆転写反応と PCR を一回の反応で行う試薬の場合は、<RT 試薬>から選択してください。その場合、<1st PCR 試薬>では<非該当>を選択してください。Nested PCR を実施しなかった場合には<非該当>を選択してください。

・ RT 試薬（15 選択肢から選択）

PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)
PrimeScript Reverse Transcriptase
PrimeScript II Reverse Transcriptase
Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR
SuperScript II Reverse Transcriptase
SuperScript III Reverse Transcriptase
SuperScript IV Reverse Transcriptase
ReverTra Ace qPCR RT
ReverTra Ace - α -
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit
PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2
PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit
SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase
SuperScript IV One-Step RT-PCR
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

・ 1st PCR 試薬名（16 選択肢から選択）

PerfectShot Ex Taq
Tks Gflex DNA Polymerase
TaKaRa Ex Taq Hot start version
TaKaRa Ex Taq
EmeraldAmp PCR master mix
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase
PrimeSTAR Max DNA Polymerase
AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase
AmpliTaq Gold DNA polymerase
Platinum II Taq DNA polymerase
Platinum SuperFi DNA Polymerase
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
KOD -Plus- Neo
KOD FX Neo
非該当
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

・ Nested PCR 試薬名（16 選択肢から選択）

PerfectShot Ex Taq
Tks Gflex DNA Polymerase
TaKaRa Ex Taq Hot start version
TaKaRa Ex Taq
EmeraldAmp PCR master mix
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase
PrimeSTAR Max DNA Polymerase
AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase
Platinum II Taq DNA polymerase
Platinum SuperFi DNA Polymerase
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
KOD -Plus- Neo
KOD FX Neo
非該当
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ PCR 産物の精製

・方法（3 選択肢から選択）

溶液から直接精製
ゲルからの切り出し精製
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

・試薬（10 選択肢から選択）

QIAquick PCR Purification kit
QIAquick Gel Extraction kit
MinElute PCR Purification kit
MinElute Gel Extraction kit
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system
ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up
PureLink PCR Purification kit
PureLink Quick Gel Extraction kit
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ シーケンス反応

・試薬（5 選択肢から選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit
DTCS Quick Start kit
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■ シーケンス反応産物の精製（ダイターミネーター除去）

・試薬または方法（9 選択肢から選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye XTerminator
Centri-Sep
AutoSeq G-50
Gel Filtration Cartridge
CleanSEQ
NucleoSEQ
エタノール沈殿
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）