

入院・重症例における AH1pdm09 インフル  
エンザウイルスの解析 2014年11月

第 46 回日本小児感染症学会 東京 2014  
年 10 月

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 インフルエンザウイルス検査内部精度管理に必要な書類リスト※

番号	分類		文書名
1-1	機器		機器使用記録簿（リアルタイムPCR装置）
	機器		機器使用記録簿（コンベンショナルPCR装置）
1-2	機器		検査機器保守管理作業日誌（リアルタイムPCR装置）
			検査機器保守管理作業日誌（コンベンショナルPCR装置）
			検査機器保守管理作業日誌（遠心分離機）
			検査機器保守管理作業日誌（微量遠心分離機）
			検査機器保守管理作業日誌（恒温槽）
			検査機器保守管理作業日誌（倒立顕微鏡）
			検査機器保守管理作業日誌（CO2インキュベーター）
			検査機器保守管理作業日誌（オートクレーブ）
2-1	試薬		試薬管理台帳
2-2	試薬		培地・試薬作成に関する標準作業書
3-1	手順	核酸抽出	検査標準作業書
3-2	手順	リアルタイムPCR	検査標準作業書（季節性、鳥各々について必要）
3-3	手順	PCR	検査標準作業書（季節性、鳥各々について必要）
3-4	手順	細胞培養	検査標準作業書
3-5	手順	分離	検査標準作業書
3-6	手順	HA・HI	検査標準作業書
3-7	手順	シーケンス	検査標準作業書
3-8	手順	H275Y マーカー	検査標準作業書

※他に、「検体運搬」、「検体受付」、「検体保管」、「検体廃棄」、「検査成績書発行」、担当職員の「研修と職場経験記録」に関する書類が必要。

## 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(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

### 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。全国で新型インフルエンザの確定検査を高い精度で実施するため、地方衛生研究所における検査体制の整備が急務となっている。本研究では、昨年度に引き続き、地方衛生研究所が行うリアルタイム 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、全国 72 カ所の地方衛生研究所を対象に実施した。

### A. 研究目的

「新型インフルエンザ等対策特別措置法」が平成 24 年 5 月 11 日に公布され、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ている。また、平成 26 年 11 月に改正感染症法が成立し、平成 28 年 4 月からは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、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。

近年、海外においては H5N1 や H7N7 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスや H3N2 亜型のブタインフルエンザウイルスなど、ヒトへの感染が散発的に発生している。2013 年 3 月には世界で初めて 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で報告され、2015 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 489 の感染例が確認されている。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。

一方で、H5N1 亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルスが 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、2015 年 1 月までに 16 カ国 694 人の感染者および 402 人の死者が確

認されている。日本では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ているが、幸いにもヒト感染例は報告されていない。しかし、ウイルス遺伝子の変異の蓄積あるいは遺伝子再構成により、これらのウイルスを起源としたヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスの出現も危惧されており、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、その検査態勢づくりの一環として、昨年度に引き続き、本年度は全国 72カ所の地方衛生研究所が行っているリアルタイム 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、検査精度向上を目的とした外部精度管理(EQA)評価を行い、トラブルシューティングによる検査精度の向上を図った。

## B. 研究方法

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1)および参加確認を兼ねたアンケートを配布した。次に本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日にかけて、パネル検体(RNA抽出が不要な6検体)を送付した。常温輸送でも劣化する事がないように、送付したパネル検体は抽出核酸の乾燥品である。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」、「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。

## C. 研究結果

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2)、「定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について」(添付資料3)、「「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4)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。

#### 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ュアル」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が、今回の 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(添付書類 4 ページ 1 表を参照)。今回の 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/ $\mu$ L であり、5  $\mu$ 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 E(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。

#### E. 結論

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、昨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、昨年度行った 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。

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 評価の実施は重要と考えられる。

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亜型同定検査が正確に行えることが非常に重要である。今後は季節性インフルエンザウイルス検出系の精度管理も重要と考えられ、本 EQA 評価を継続的に行う事が精度管理に有用と考えられる。

なお、今回の EQA では精製した RNA を使用しており、核酸精製の評価は行っていない。そのため次回以降は、臨床検体の検査を行う際に必要な核酸精製のステップを入れた EQA 評価の導入が必要と考えられる。ただし、対象施設が 70 カ所以上もあるため、EQA 評価を実施する側で、膨大な量の EQA の準備および解析等の作業が必要で、負担が非常に大きいのが現状である。

もう少し細かく幅広い範囲で EQA 評価を行う事が望ましいが、地方衛生研究所での検査する負担と EQA を実施する側の負担を考えると、パネル検体数をこれ以上増やす事が難しいと考えられる。準備、解析作業の一部を外注化して省力化を図る事も必要と考えられた。

該当なし  
3.その他  
該当なし

## F. 研究発表

### 1.論文発表

なし

### 2. 学会発表

国内会議

なし

### 3.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

## 添付文書 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 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。

## 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、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

## 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)。

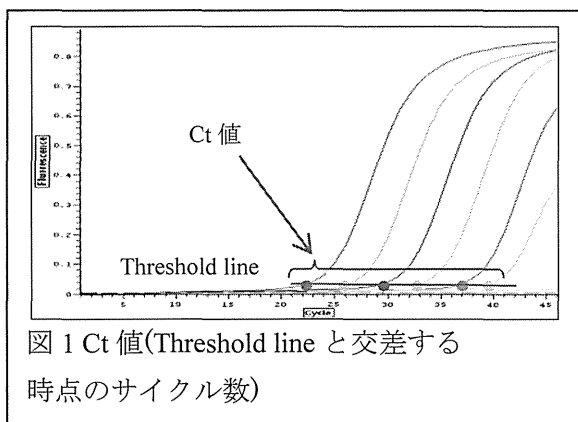


図 1 Ct 値(Threshold line と交差する時点のサイクル数)

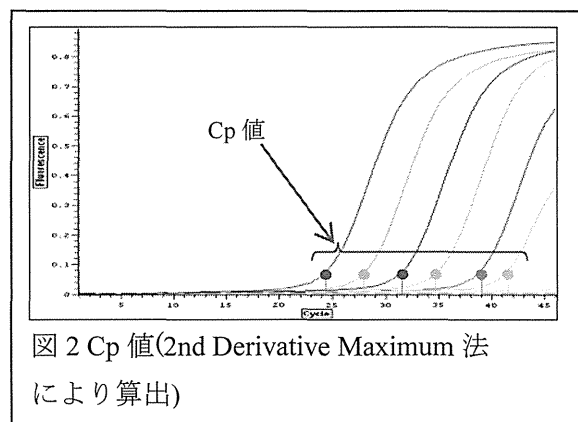


図 2 Cp 値(2nd Derivative Maximum 法により算出)

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)。

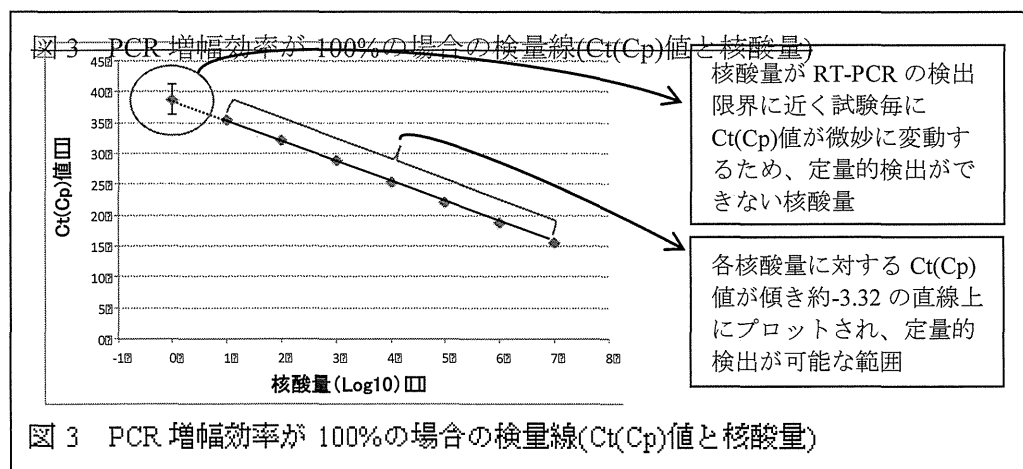


図 3 PCR 増幅効率が 100%の場合の検量線(Ct(Cp)値と核酸量)

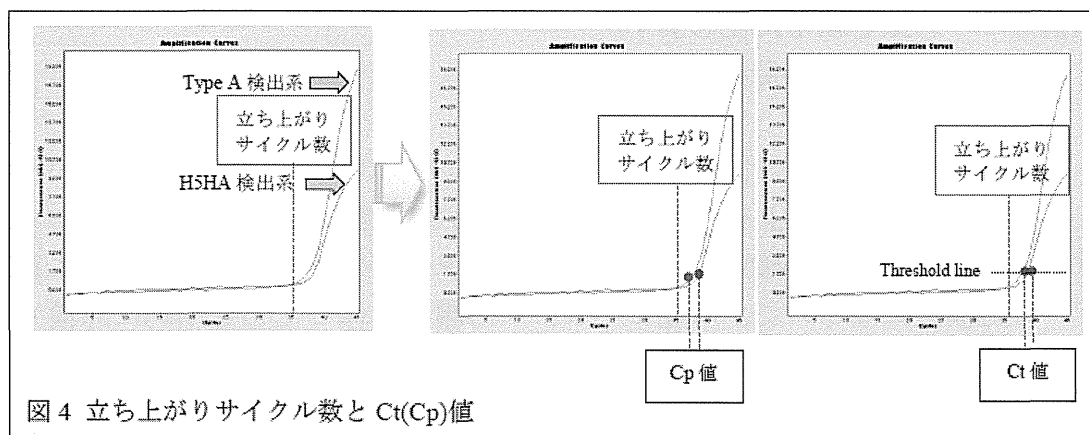
## 2. 精度管理について

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)
  - 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

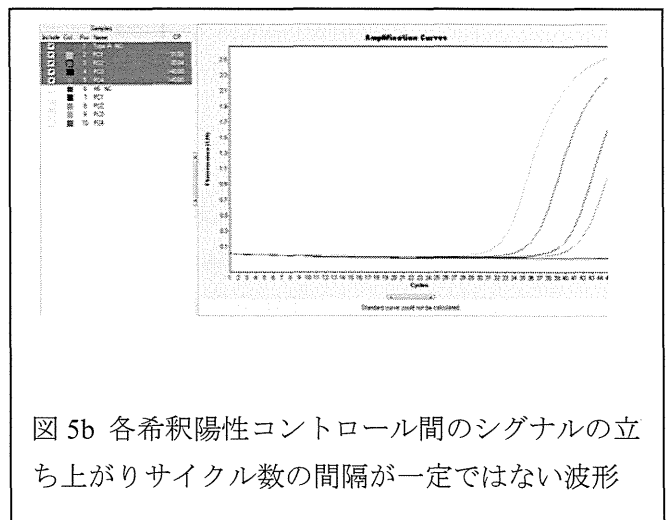
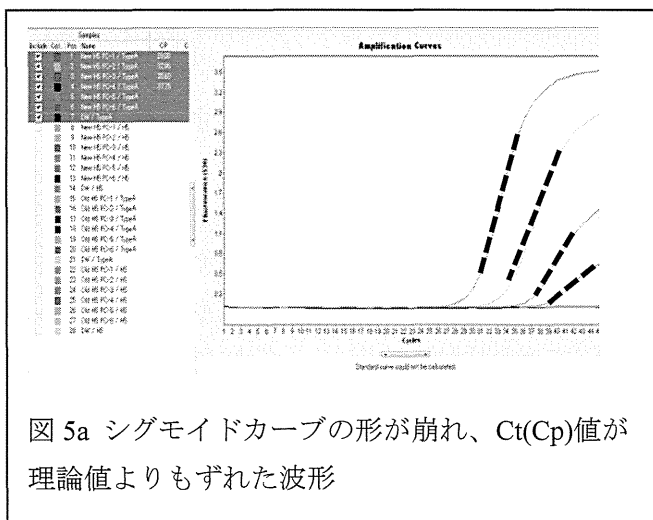
検出限界は変化します。原因が複数考えられると、検査精度管理が難しくなります。まずは検査手技の習熟と検査精度に関する意識向上に努める事が重要となります。

### 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、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。

## 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、原因特定の仕方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)。

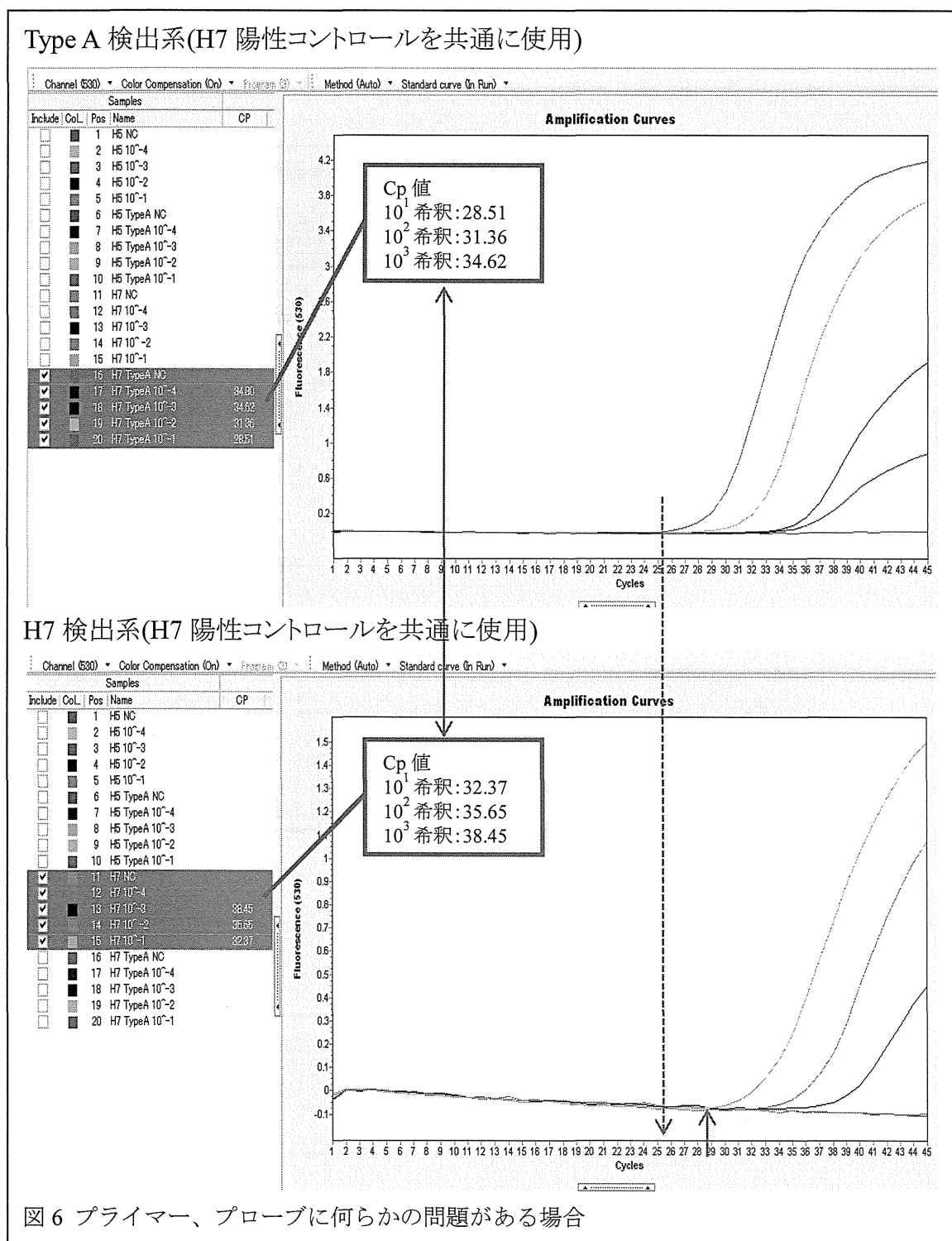
原因：H7 検出系に何らかの問題があったため、シグナルの立ち上がりサイクル数が Type A 検出系よりも遅れたと考えます(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)。このようなケースでは、プライマー、プローブに問題がある場合がほとんどであり、その原因として次の可能性が考えられます。

- 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。

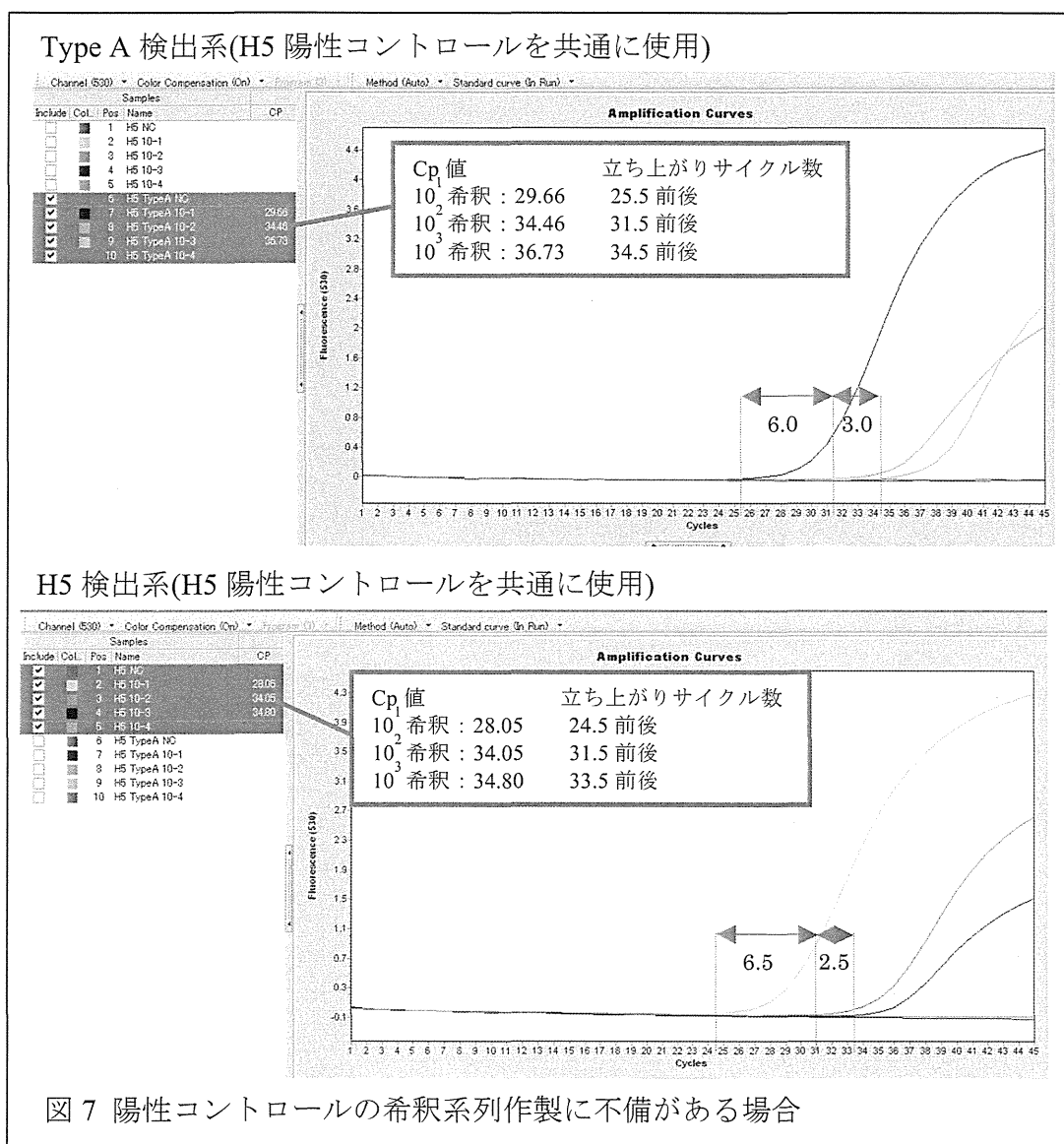
なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理されたものを使用して下さい。また、新たに保管するプライマー、プローブが劣化

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)。



## (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。



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。

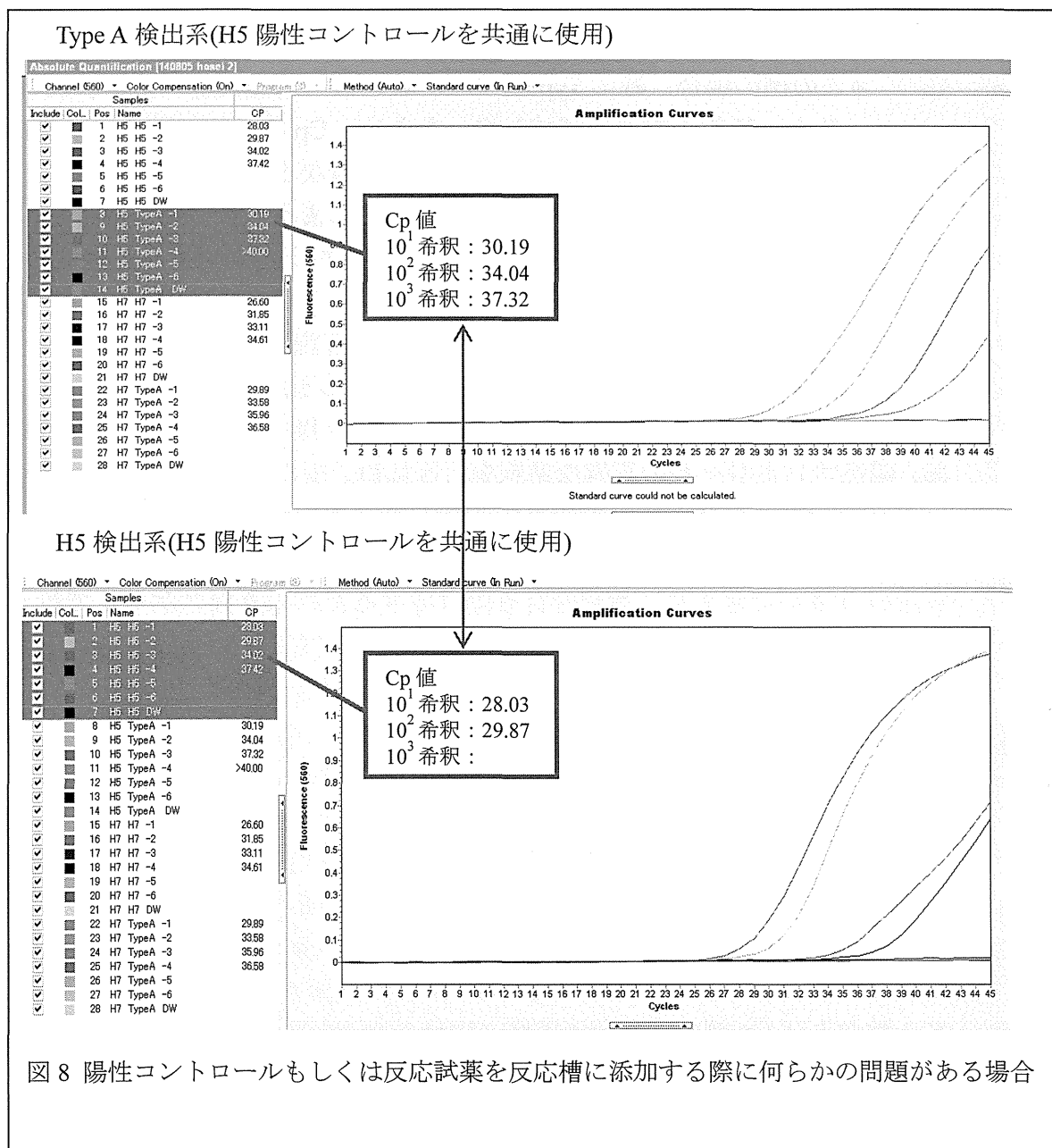
(3) 陽性コントロールもしくは反応試薬を反応槽に添加する際に不備がある場合の一例(図 8)

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 値の間で若干の乖離があり、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。

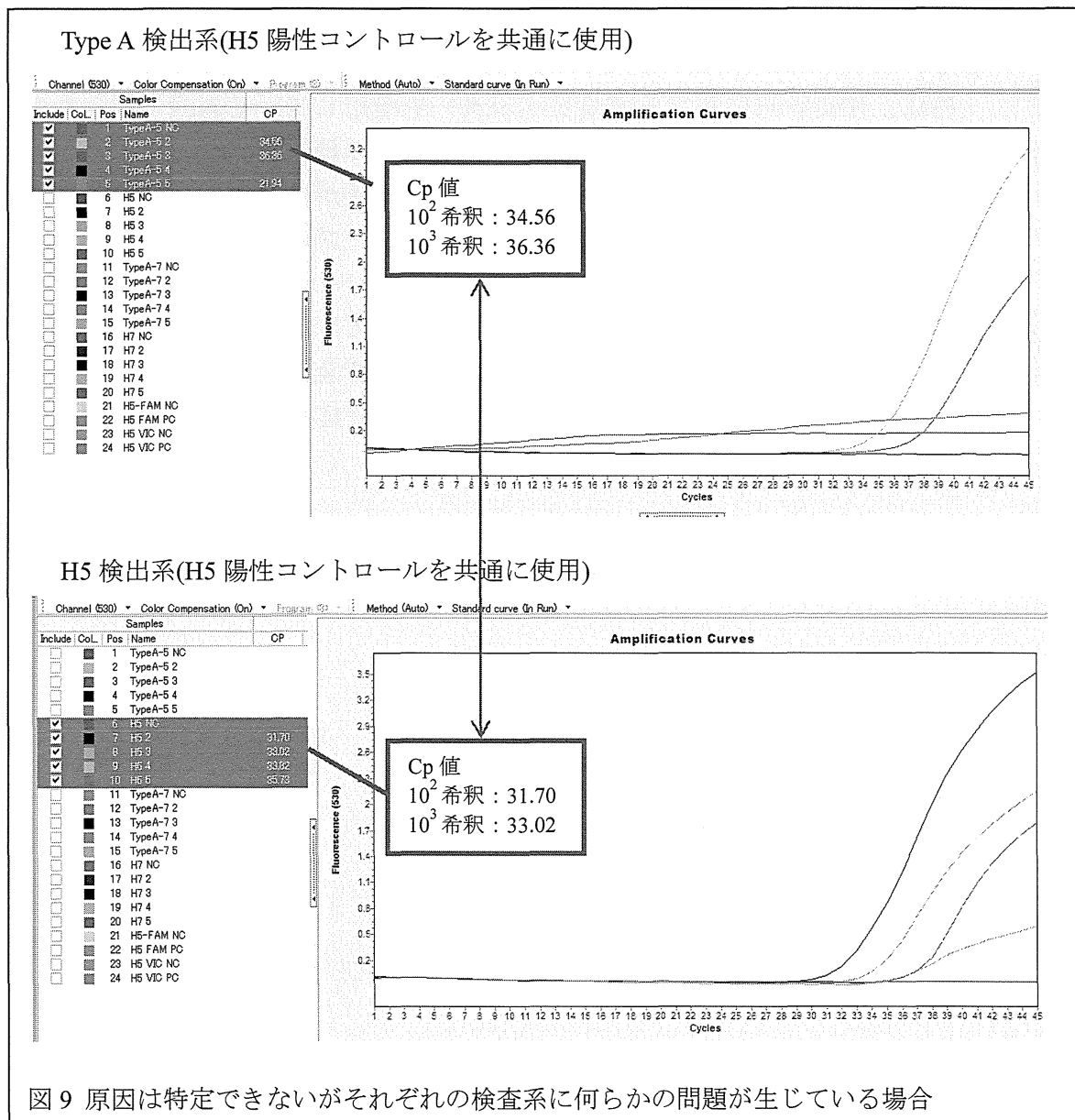
対処方法：この場合も、一部で微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取

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。



(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。

#### (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。