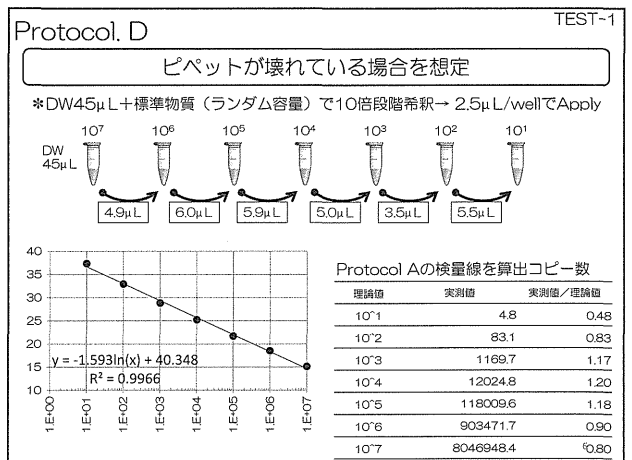
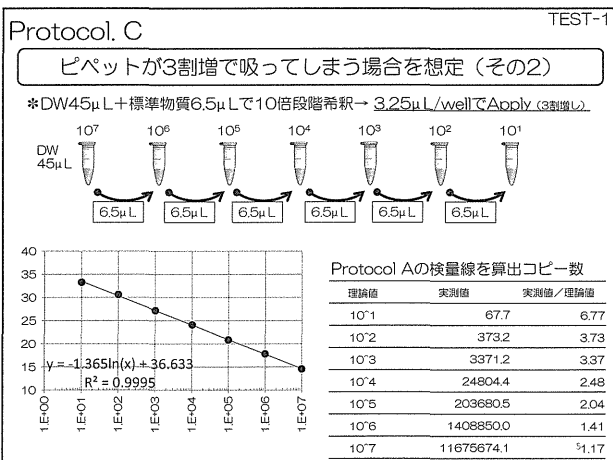
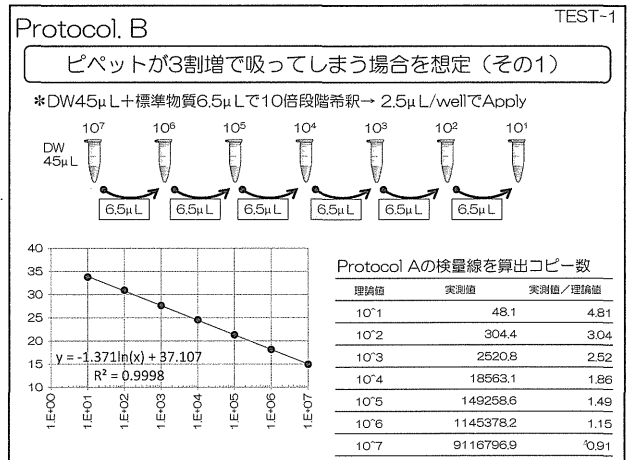
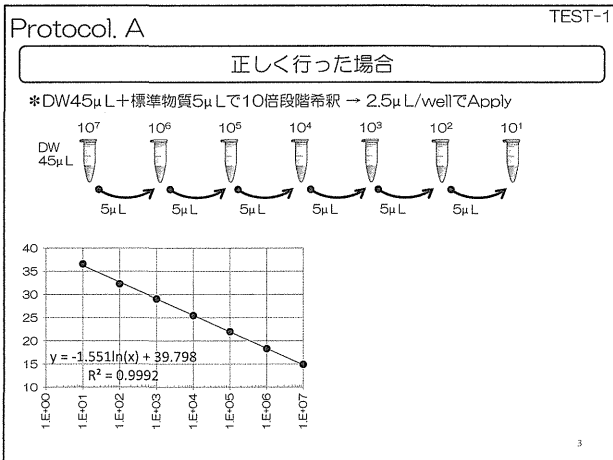
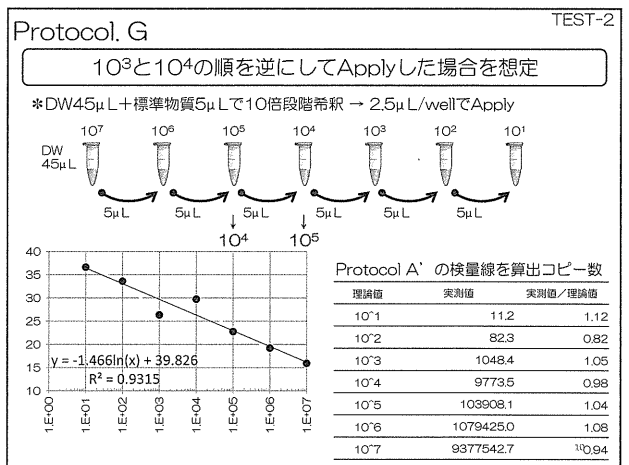
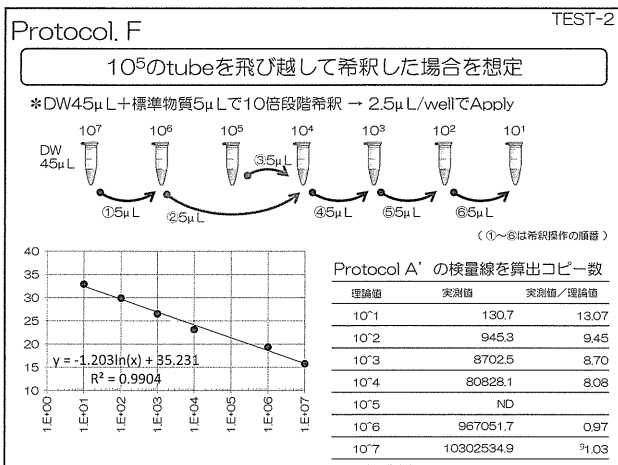
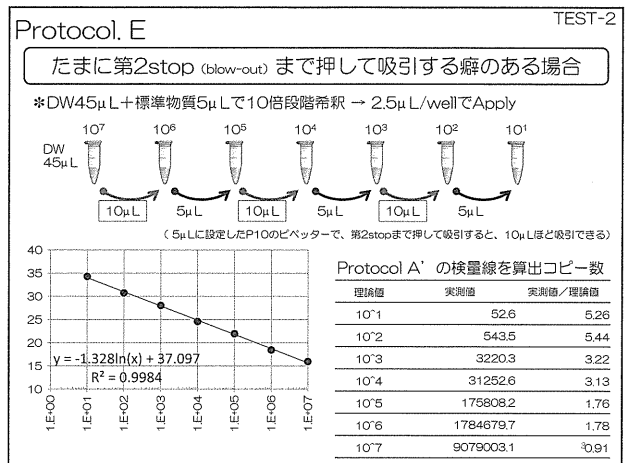
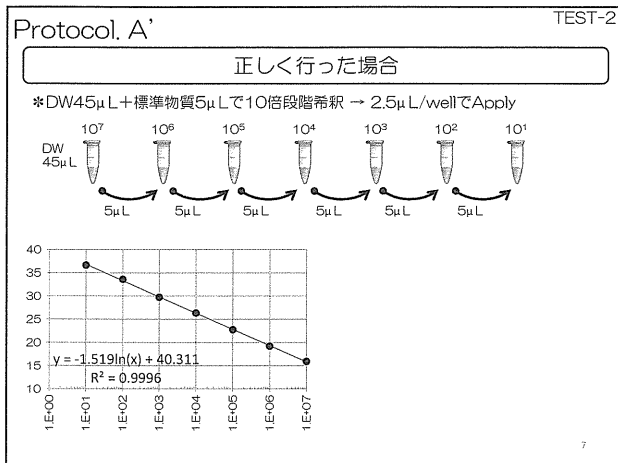


Test Design	
<b>Test-1</b> ピペットの故障などを原因とする場合	
Protocol. A	正しく行った場合
Protocol. B	ピペットが3割増で吸ってしまう場合を想定 (その1)
Protocol. C	ピペットが3割増で吸ってしまう場合を想定 (その2)
Protocol. D	ピペットが壊れている場合を想定
<b>Test-2</b> 検査する者のテクニカルエラーの場合	
Protocol. A'	正しく行った場合
Protocol. E	たまたま第2stop (blow-out) まで押して吸引する際のある場合
Protocol. F	10 <sup>5</sup> のtubeを飛び越して希釈した場合を想定
Protocol. G	10 <sup>3</sup> と10 <sup>4</sup> の順を逆にしてApplyした場合を想定

	Test 1				Test 2			
	A	B	C	D	A'	E	F	G
Ct値 (実測値)								
10 <sup>-1</sup>	36.58	33.79	33.26	37.37	36.6	34.3	32.9	36.6
10 <sup>-2</sup>	32.26	30.93	30.61	32.94	33.6	30.7	29.9	33.6
10 <sup>-3</sup>	29.07	27.65	27.20	28.84	29.7	28.0	26.5	26.4
10 <sup>-4</sup>	25.47	24.55	24.10	25.23	26.4	24.6	23.1	29.7
10 <sup>-5</sup>	21.99	21.32	20.84	21.68	22.8	22.0	ND	22.8
10 <sup>-6</sup>	18.31	18.16	17.84	18.53	19.2	18.4	19.4	19.2
10 <sup>-7</sup>	14.91	14.94	14.56	15.14	15.9	16.0	15.8	15.9
検量線	$y = -1.551 \ln(x) + 39.798$ 38.798	$y = -1.371 \ln(x) + 37.107$ 37.107	$y = -1.365 \ln(x) + 36.633$ 36.633	$y = -1.593 \ln(x) + 40.348$ 40.348	$y = -1.510 \ln(x) + 40.311$ 40.311	$y = -1.328 \ln(x) + 37.097$ 37.097	$y = -1.203 \ln(x) + 35.231$ 35.231	$y = -1.469 \ln(x) + 39.826$ 39.826
R <sup>2</sup> 値	0.9992	0.9998	0.9995	0.9966	0.9996	0.9984	0.9904	0.9315
Protocol A (for A')で検量線を算出コピー数								
10 <sup>-1</sup>	8.0	48.1	67.7	4.8	11.2	52.6	130.7	11.2
10 <sup>-2</sup>	128.7	304.4	373.2	83.1	82.3	543.5	945.3	82.3
10 <sup>-3</sup>	1008.4	2520.8	3371.2	1169.7	1048.4	3220.3	8702.5	9773.5
10 <sup>-4</sup>	10301.0	18563.1	24804.4	12024.8	9773.5	31252.6	80828.1	10484.4
10 <sup>-5</sup>	96950.0	149258.6	203680.5	118009.6	103908.1	175808.2		103908.1
10 <sup>-6</sup>	1039009.9	1145378.2	1408850.0	903471.7	1079425.0	1784679.7	967051.7	1079425.0
10 <sup>-7</sup>	9328541.2	9116796.9	11675674.1	8046948.4	9377542.7	9079003.1	10302534.9	9377542.7





**結果と考察**

\* 研修の失敗例は、Protocol F、もしくは、Gが候補

Protocol	R <sup>2</sup> 値	検量線	備考
F	Good (0.99)	No Good	R2値はgoodだが、検量線が不正になる。
G	Bad (0.93)	OK	R2値は低くなるが、検量線は正確に近い状態になる。

\* 見ている人に気が付かれずに実行するには、工夫が必要。  
(別のことに注目させているうちに済ませる等) (特にProtocol Fの場合は、特に)

\* Protocol Gでは、決定係数から検量線の妥当性が担保できないが、最終的なコピー数の算出に影響がなくなる。

(感想) いくつかのパターンを想定しても、失敗例にはならず、驚きました。検量線が引けない理由の殆どが、テクニックやピペットではなく、測定機器等の不具合や標準物質の失活などが多いのではと、感じました。

**追記** (余談ですが、最近、リアルタイムPCR関連で当センターで問題になっていることを記載します。皆様のラボでも同じようなことが発生して、解決したなどの話題がありましたら、ご教示いただくと幸いです。)

\* 昨年度から、当センターでは、下記の理由からリアルタイムPCRに8連tubeを導入しました。  
・ 96 well-plateより低コスト  
・ 検体と陽性Controlを、同時進行で、別の人が準備が可能 (汚染防止と時間短縮)

\* しかし、頻繁に濡れる (参照; 下記の写真)

\* メーカーと相談しても解決せず

\* ブロックが汚染する心配  
→ 主にPlateを使用する方針に戻すことを検討中。

## リアルタイムPCR法の基礎と応用

国立感染症研究所  
感染症疫学センター  
木村 博一

1

### 地方衛生研究所の機能強化について (平成9年3月14日厚生省発健政第26号)

地方衛生研究所設置要綱

#### I. 設置の目的

地方衛生研究所は、地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上及び増進を図るため、都道府県又は指定都市における科学的かつ技術的中核として、関係行政部局、保健所等と緊密な連携の下に、調査研究、試験検査、研修指導及び公衆衛生情報等の収集・解析・提供を行うことを目的とする。

#### II. 業務

##### 一 調査研究

(1) 地方衛生研究所は、次のような調査研究を行うものとする。

1. 疾病予防に関する調査研究
2. 環境保健に関する調査研究
3. 生活環境施設に関する調査研究
4. 食品及び栄養に関する調査研究
5. 医薬品等に関する調査研究
6. 家庭用品、化学物質等に関する調査研究
7. 健康事象に関する疫学的調査研究
8. 健康の保持及び増進に関する調査研究
9. 地域保健活動の評価に関する調査研究
10. 試験検査方法に関する調査研究
11. その他必要な調査研究

2

## PCRの考案者と歴史

考案者: Kary Banks Mullis

1983年ドライブ中に原理を考案

Sci Am. 262(4):56-61, 64-5, 1990.

1987年最初の論文発表

Mullis KB, Faloona FA. Methods Enzymol. 155:335-50, 1987.

1988年Science誌発表

Saiki RK et al., Science. 239(4839):487-91, 1988.

1993年ノーベル化学賞受賞

Kary Banks Mullis

1944年12月28日生

ジョージア工科大卒・UCLA大学院修了

PCR開発時シータス社勤務



3

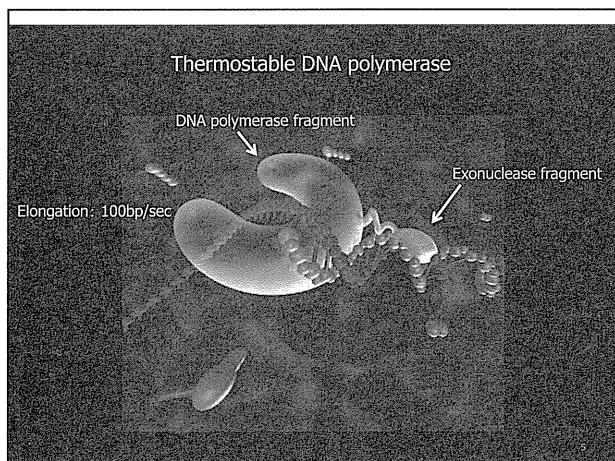
## PCR法の特徴

- ・(標的)DNAを特異的に増幅
- ・迅速(数時間)
- ・反応系と実験プロセスが単純



広範囲の医学研究・検査に応用可能

4



## リアルタイムPCR法の測定原理

6

PCR産物(amplicon)増幅効率について

$$[DNA \text{ (amplicon)}] = [DNA]_0(1+e)^C$$

[DNA]<sub>0</sub>=初期鋳型DNA量(数)  
e=増幅効率  
C=サイクル数

サイクル数	相対量 (増幅効率:100%)	相対量 (増幅効率:85%)
10	1,024	~500
20	1,048,576	~200,000
30	1,073,741,824	~100,000,000
40	~1,099,511,628,000	~50,000,000,000

7

Real-time PCR法の特徴と応用範囲

特徴

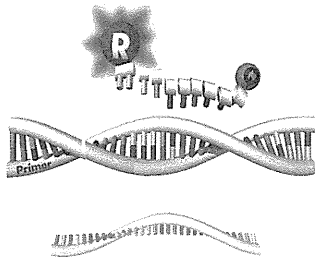
- ・高感度 (Nested PCRとほぼ同等)
- ・定量的
- ・特異的 (hybriprobe, TaqMan Probe)
- ・多検体同時検出
- ・迅速

応用範囲

- ・種々のウイルスゲノムの検出・定量など
- ・SNPs (single nucleotide polymorphisms)検出など

3

TaqMan ProbeによるリアルタイムPCR法の原理

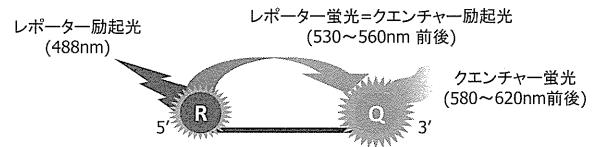


From: Applied Biosystems, modified

TaqMan Probe の構造・性質

- ・励起光照射によりTaqMan Probeのレポーター蛍光色素が蛍光を発する。
- ・レポーターの蛍光波長がクエンチャーの励起波長に近い場合、クエンチャー励起エネルギーとなり、レポーターの蛍光が抑制される。

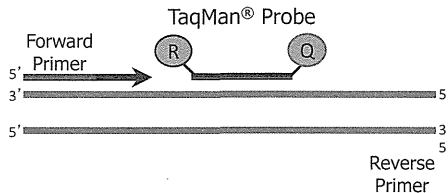
蛍光共鳴エネルギー転移現象 (FRET)



From: Applied Biosystems, modified

TaqMan ProbeとPrimerの設計

- ・目的の配列を含む領域でPrimer・TaqMan Probeを設計する



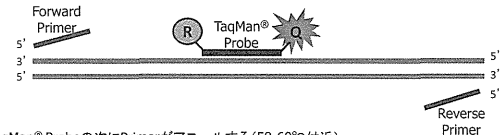
PCR primer (T<sub>m</sub>=58~60°C)  
目的配列を含む150bp程度の領域を増幅するように設計

TaqMan Probe(T<sub>m</sub>=68~70°C)  
5'末端側にレポーター蛍光色素、3'末端側にクエンチャーを色素を付加

From: Applied Biosystems, modified

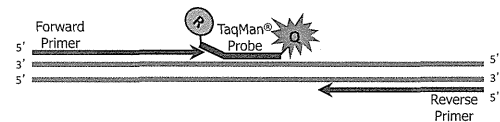
TaqMan PCR Assay

TaqMan® ProbeはPrimerよりも先にアニールする (68-70°C付近)



TaqMan® Probeの次にPrimerがアニールする (58-60°C付近)

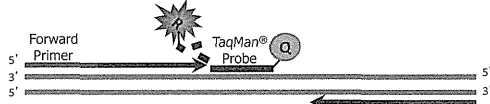
Primer部位にTaq DNA polが結合して伸長反応が進む



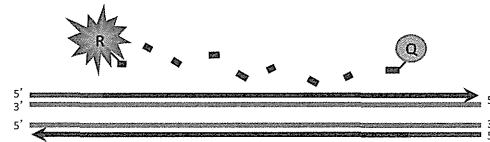
From: Applied Biosystems

### TaqMan PCR Assay

DNA Polの伸長方向にDNAがあると、分解される(5'-3' exonuclease activity)



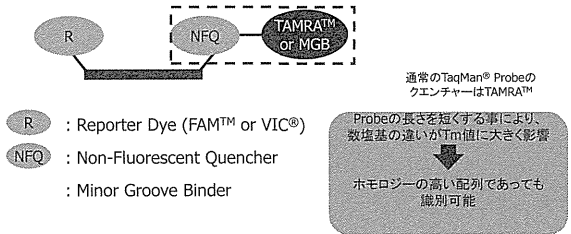
TaqMan®Probeが分解されるとレポーターの蛍光が発せられる



From : Applied Biosystems, modified

### TaqMan MGB Probeの特徴

- Tm EnhancerであるMGBを付加し、より短いProbeを設計可能
- 短いProbe長により1塩基置換でもTm値の差が顕著
- NFQの採用により、バックグラウンドを低く抑えることが可能



- R : Reporter Dye (FAM™ or VIC®)
- NFQ : Non-Fluorescent Quencher
- MGB : Minor Groove Binder

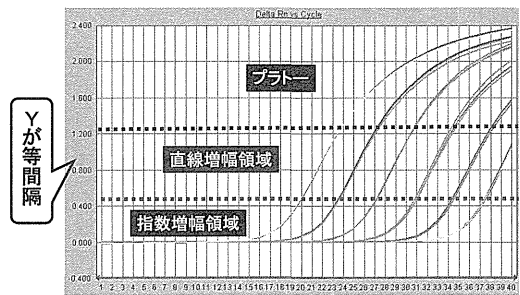
通常のTaqMan® ProbeのクエンチャーはTAMRA™  
 Probeの長さを短くする事により、数塩基の違いがTm値に大きく影響  
 ↓  
 ホモロジーの高い配列であっても識別可能

### Summary of TaqMan Chemistry

- TaqMan Probeが分解されることによって生じる蛍光を検出する
- 従来のPCR反応より、特異性が高い
- 蛍光量がPCRの増幅量を正確に反映する
- 2種類の蛍光を用いて2 probeアッセイを行えば、サンプルの有効利用やコストダウンが可能 (SNPsのタイピング)。
- Primer/Probe濃度の検討は不要 (シングルプレックスの場合)

From : Applied Biosystems, modified

### リアルタイムPCR増幅曲線

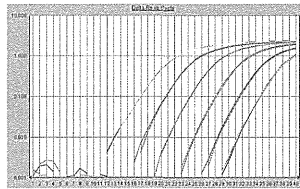


16

### Principles of Real-time PCR

PCR: theoretical...  
 $DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

n : Cycle No.  
 DNA<sub>n</sub> : PCR products at n cycles  
 DNA<sub>0</sub> : initial copy No.  
 e : PCR amplification efficiency



PCR産物が指数関数的増幅サイクルにおいては...  
 PCR産物量と初期量とサイクル数の間には高い相関性がある  
 ウイルス遺伝子定量:理論値で増幅効率100%になるよう設計  
 増幅長(100bp程度)

17

### Real-time PCR using Fluorescence Probes

- Real-time PCRでは、PCR産物量を蛍光データに変換し、蛍光強度を測定する
- PCR産物量を蛍光データに変換するための Probe

- SYBR® Green assay
- TaqMan® assay



18

### 標準曲線用プラスミドコントロール作成法

19

### Ct値と標準曲線の目安

$DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

Threshold Line

増幅効率100%: Ct30で10<sup>3</sup>コピー

Threshold Cycle ( $C_T$ )  
N values for  $DNA_0$

20

### Quantitation of Target Gene by Standard Curve

$C_T$  value: 29

6424 copies (Initial No)

$DNA_0$  (Initial No)

21

### 反応条件の設定のための試験

22

### Optimization of annealing temperature

56°C  
58°C  
60°C

23

### Quantitation of Target Gene by Standard Curve

$DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

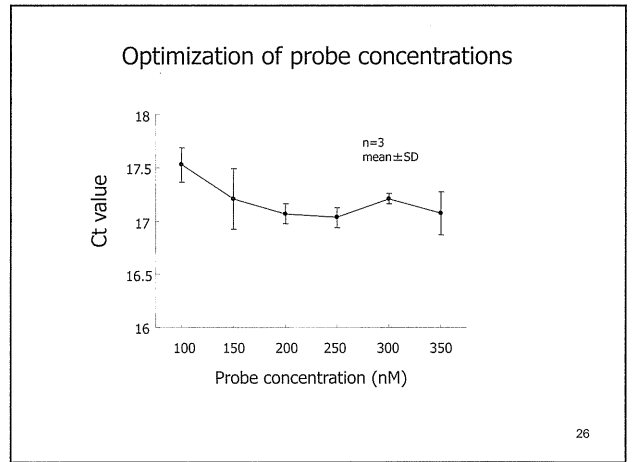
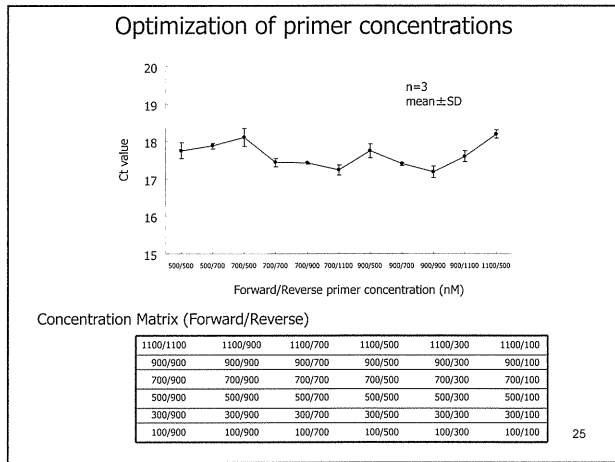
PCR効率が100%なら  
 $DNA_n = DNA_0 \times 2^n$

↓  
サイクル数の差が初期量の差を反映する  
1サイクル→2倍  
3.3サイクル→10倍

↓  
サイクル数の差から初期量の差を求めることも可能

From: Applied Biosystems

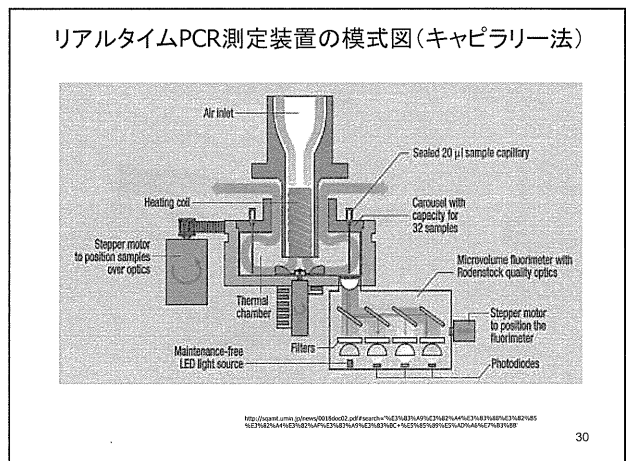
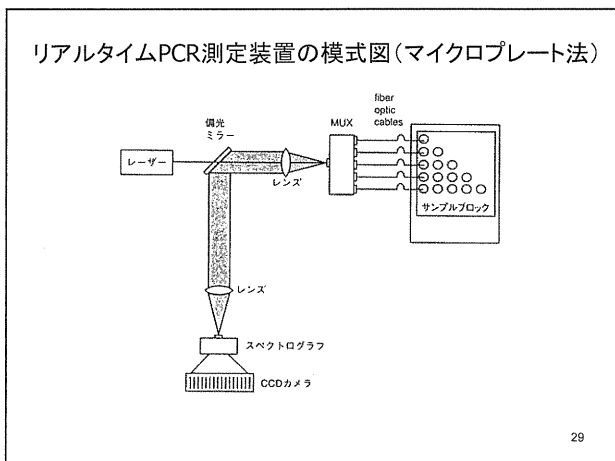
24



### リアルタイムPCR測定装置について

27

- ### リアルタイムPCR測定装置のバリエーション
- ・光学(光源)系(レーザー、ハロゲンランプ、LED)
  - ・検出光学系(CCDカメラ、レンズ+蛍光強度計)
  - ・反応容器(マイクロプレート、キャピラリー)
- 28



測定装置のトラブルシュートと保守点検について

- ・光学系:光源の劣化、検出装置の劣化、光軸のずれ
- ・増幅系:測定容器の温度制御



定期的な機器保守点検が必要

31

試薬などに関する注意点

- ・プライマー、プローブの保存管理  
適切な濃度と温度管理(-80°C)  
繰り返し凍結融解を避ける  
蛍光プローブの遮光保存
- ・陽性コントロールの保存管理の徹底(-80°C)  
適切な濃度と温度管理  
繰り返し凍結融解をしない
- ・エアロゾル発生をさせない  
試料間とウエル間のコンタミネーションを回避

32

試薬取り扱い・コントロール希釈の注意点

- ・最初に、希釈液をチューブに入れ、テンプレートを加えてよく混合する
- ・スピンドウン操作とエアロゾル対策の徹底  
チューブ間の検体由来鑄型やDNaseコンタミを避ける
- ・コントロール段階希釈時はチップを交換する

33



## 研修実施時期について

<b>Q1</b> 精度管理実施から研修 までの期間	① 半年以内がよい	4
	② 半年～1年以内がよい(今回)	5
	③ 特にこだわらない*	1

\*研修あれば時期はいつでも可. 研修ないときは報告書を早くみたいので  
研修も早くしてほしい

## 研修内容(第1日目)について

<b>Q2</b> 良かった点 複数回答可	① 前年度の結果の確認	5
	② 各所属での対応についての発表	8
	③ 問題点の抽出などのグループミーティング	10
	④ 全体討論でのトラブルシューティングの作成	7
	⑤ その他*	0
	⑥ なし	0

<b>Q3</b> 悪かった点 複数回答可	① 前年度の結果の確認	0
	② 各所属での対応についての発表	0
	③ 問題点の抽出などのグループミーティング	0
	④ 全体討論でのトラブルシューティングの作成	0
	⑤ その他*	0
	⑥ なし	9

## グループミーティングについて (1グループに参加者5名、進行役1名)

<b>Q4</b> グループミーティングの 人数 (①あるいは②を選んだ 場合、適切な人数を記 入してください)	① 多い	0
	② 少ない	0
	③ 適切	10

<b>Q5</b> グループミーティングの 時間	① 十分	5
	② 少ない	5
	③ 多い	0
	④ その他*	0

<b>Q6</b> グループミーティングに 対する感想を記入してく ださい	・自分と同じ問題が出され、その対処法が聞けて良かった
	・もう少し時間が欲しい
	・自分の問題と同じことについて話し合いができたのは有意義だった
	・すぐに答えてくれるので効率的であった
	・各施設の様子が聞けて参考になった
	・とても有意義だった
	・施設ごとに問題点や対応について話す時間が十分あり有意義だった
・時間が少なく十分な話ができなかった	

## 全体討論について

<b>Q7</b> 全体討論でのトラブル シューティングについて	① 十分であり納得している	3
	② それなりに納得している	7
	③ どちらでもない	0
	④ やや不満があり不十分と感じる	0
	⑤ 不十分である	0

<b>Q8</b> 今回のトラブルシューティングは役に立つと思いますか	① 思う	7
	② やや思う	3
	③ どちらでもない	0
	④ あまり思わない	0
	⑤ 役に立たない	0
	⑥ その他*	0

<b>Q9</b> Q8での理由を記入してください	・評価されるだけでなく、改善すべき点が明確になる
	・ほかの機関の対応を聞いて参考になった
	・どのトラブルも心当たりがあり、今後も起こるかもしれないので吸収できた
	・同じ検査を行っている他の施設の話が聞けてよかった
	・トラブル時のチェックポイントが参考になり職場に持ち帰りたい
	・今回は役立つが完璧には解決できていないと思う
	・機器の管理、試薬、ピペットのことまで議論できてよかった
	・もっとじっくり話してもよかった
・基本的なことを再確認でき、新たに得られた知見もあった	

<b>Q10</b> 全体討論のメンバー	① 今回のままで良い	5
	② 感染研の専門家を加えた方が良い	0
	③ 試薬会社など民間の担当を加えた方がよい	4
	④ その他*	1
	*毎回違う衛研の参加がいい	
	リアルタイムの会社によるメンテなどの詳細説明	

今後の検討課題について

<b>Q11</b> もう少し詳しく知りたい内容 複数回答可	① 基本的な操作技術	2
	② 試薬の維持管理	5
	③ 実験室の維持管理	3
	④ コンタミなどが起きた時の対応	2
	⑤ データ解釈で注意すべき点	7
	⑥ その他*	0

## 研修内容(第2日目)について

<b>Q1</b> 良かった点 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	5
	② リアルタイムPCRの基本の講義	9
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	5
	④ 試薬調製等の基本的手技	8
	⑤ その他*	2
	⑥ なし	0
	*トラブルシューティング デモ中などのディスカッションが良かった	
<b>Q2</b> 悪かった点 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	0
	② リアルタイムPCRの基本の講義	0
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	0
	④ 試薬調製等の基本的手技	0
	⑤ その他*	2
	⑥ なし	8
	*全員が手を動かし、手技の確認ができるとなおよかった。 実技がもう少しあるとよかった	
<b>Q3</b> もう少し詳しく行って欲しかった内容 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	2
	② リアルタイムPCRの基本の講義	0
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	1
	④ 試薬調製等の基本的手技	1
	⑤ その他*	1
	⑥ なし	5
	*結果データ解析法。どのような場合に検査をやり直すか。	
研修全体について		
<b>Q4</b> 研修後の技術や理解度の向上(個人-1) 複数回答可	① リアルタイムPCRに対する理解が深まった	6
	② 試薬調製や機材の操作の技術が向上した	5
	③ 適切なトラブルシューティングが期待できる	7
	④ その他*	0
	⑤ 特に無し	0
<b>Q5</b> 研修後の技術や理解度の向上(個人-2) 複数回答可	① 手技などにおいて改善点がたくさん見つかった	8
	② あまり多くの改善点は見つからなかった	1
	③ 改善する点はない	0
	④ その他*	1
	*①と②の間	
<b>Q6</b> 職場での研修内容の伝達方法 複数回答可	① 伝達講習会	2
	② 担当者間での打ち合わせ	7
	③ 復命書	6
	④ その他*	2
	⑤ 特に無し	0
*朝のミーティング ②③実施済み、①実施予定		
<b>Q7</b> 職場で研修内容を伝達した結果	① 職場での技術向上につながった	7
	② 職場での導入は困難	0
	③ 技術向上につながるとは考えづらい	0
	④ その他*	3

	⑤ 特に無し	0
	*ウイルス担当内での反省、技術向上につながった結果がまだわかりません。①になるようにしたい。	
	ピペット操作やチューブの取り扱い等を少しずつ改善していきたい	
	復命書のみでうまく伝わるかどうかわからない	
	手袋を交換するなど向上(改善)する部分もあるが、チューブやピペットなどの操作で個人の癖は、その人が意識しないと直らないものなので一緒に見ていてその時は、直っても続くかという難しいので課題です	
<b>今後の検討課題について</b>		
<b>Q8</b>	<b>望ましい研修時期</b>	
	① 7-9月	8
	② 10-12月	1
	③ その他*	1
	*6月	
<b>Q9</b>	<b>望ましい研修期間</b>	
	① 1日	2
	② 2-3日	7
	③ その他*	1
	*1~2日	
<b>Q10</b>	<b>研修の内容</b>	
	① 講義中心が良い	1
	② 実習中心が良い	2
	③ その他*	7
	*両方 議論する場面が多いほうが良い	
<b>Q11</b>	<b>行って欲しい講義内容</b>	
	複数回答可	
	① リアルタイムPCRの基本	7
	② リアルタイムPCRのトラブルシューティング	8
	③ 白衣等の着脱	2
	④ 実験室のデザイン	3
	⑤ 試薬の保管・管理・取り扱い	6
	⑥ ピペットの操作	1
	⑦ チューブの取り扱い	0
	⑧ 使用済み器具の廃棄	2
	⑨ その他*	0
<b>Q12</b>	<b>行って欲しい実習内容</b>	
	複数回答可	
	① リアルタイムPCRの基本	0
	② リアルタイムPCRのトラブルシューティング	2
	③ 白衣等の着脱	3
	④ 実験室のデザイン	1
	③ 試薬の保管・管理・取り扱い	6
	④ ピペットの操作	5
	⑤ チューブの取り扱い	4
	⑥ 使用済み器具の廃棄	2
	⑦ その他*	1
	*リアルタイムPCRの解析の仕方	
<b>Q13</b>	<b>研修対象者は誰が良いか</b>	
	① 係長などのグループ長	0
	② 実際の検査を行っている中での年長者	2
	③ 最も検査を行う者	8
	④ その他*	1
	*各地研により適任者は異なると思う	

資料9(フォローアップ調査例)

H27年度外部精度管理実施後研修会 グループミーティング・ワークシート(まとめ) 機関名:

	問題点	考えられる原因	解決のための処置
1日目	・標準物質の10コピーが不検出	・温度(室温×) 濃度が薄ければ薄いほど	・標準物質の管理
	・G I、G IIともにCt値が大きい	・標準物質の劣化 ・ピペッターの操作	・氷冷
	・R <sup>2</sup> が0.99以下	・標準物質の劣化 ・希釈	・新しい標準物質に変更＝保管(温度) ・記録をつける ・計算のダブルチェック ・凍結融解を繰り返さない 濃度が薄いと加水分解しやすい
	・標準物質(<10 <sup>3</sup> コピーDNA)でばらつき	・濃度の計算ミス ・標準物質の希釈 ・測定機器の測定ブロックの汚染	・チューブのスピンドアウンを2回 よく攪拌 <u>ピペティングはしない</u> ・測定ブロックの汚染除去
	問題点	考えられる原因	解決のための処置
2日目	・標準物質の10コピーが不検出	・温度(室温×) 濃度が薄ければ薄いほど	・希釈系列での保管→低濃度DNAではチューブ内への付着等によりロスが大きい
	・G I、G IIともにCt値が大きい		・試薬の管理
	・標準物質(<10 <sup>3</sup> コピーDNA)でばらつき	・ピペッターの精度 ・サンプル添加時のピペッターの操作	・ピペッターの保守 ・目視でよく確認(量の違いに気づく目を持つ) ・管壁、管底を使い分けたサンプル添加 →チューブ内の高い位置で添加するとエアロゾルの原因
	研修担当者の指摘事項	コメント	
	・標準物質:希釈倍率が高いポイントではCt値にばらつき→ピペティング操作(希釈)に問題 ・標準物質の劣化	・標準物質のCt値が高い→管理に問題あり ・標準物質の希釈では溶液をしっかりと攪拌する ・検査の確認を誰かにしてもらってもよかった。他の人がやったデータと比較したことがあるか	
	問題点	解決方法とその成果	
参加者	・標準物質の10コピーが不検出 ・標準物質がばらつく	標準物質の攪拌方法をタッピングとボルテックスにしたことにより、10コピーも検出され、R <sup>2</sup> が0.99以上の安定した検量線を得られるようになったことから、標準物質の攪拌方法に問題があったことが、一番大きな原因であったことがわかった 毎回希釈系列の作成を実施することが望ましいことは分かっているが、実際には難しいことから、1つの希釈系列を2回から3回で使い切るような形をとるようにした 現在、担当者間では情報の共有はできており、また、リアルタイムPCRを実施している保健所に対しても伝達講習を実施し、実際のデータの確認を取ってもらっているところであるが、今までよりもいいデータを得ることができた、タッピングによる攪拌は従来より手間がかからないと言った意見をj得ている	

資料 10

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）

日時：9月10日（木）13：30～17：00

9月11日（金）9：00～15：00

場所：国立感染症研究所村山庁舎 講義室および実習室（6号棟6階）

内容：On the job training を模したグループミーティング形式で、ノロウイルスリアルタイム PCR のトラブルシューティングを行う。さらに、実習を通して問題が解決できたかを確認する。

第1日目

13：30～13：40

講義室

- ・開会の挨拶（研究代表者、富山県衛生研究所：佐多）

13：45～15：25

講義室および講師控室

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング（富山県衛生研究所：小淵、東京都健康安全研究センター：貞升）

休憩

15：40～17：00

講義室

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：全体討論（東京都健康安全研究センター：貞升、富山県衛生研究所：小淵）
- ・総括
- ・研修後アンケート

第2日目

9：00～10：30

実習室

- ・リアルタイム PCR 実習：模範例および手技的失敗例のデモ（群馬県衛生環境研究所：塚越、栃木県保健環境センター：水越）

休憩

10：45～12：00

## 資料 10

### 講義室

- ・リアルタイム PCR 基礎講座：講義（国立感染症研究所：木村）

### 昼食

13：00～15：00

### 講義室

- ・結果の解析：解説および討論（栃木県保健環境センター：水越、群馬県衛生環境研究所：塚越）
- ・総括（富山県衛生研究所：小渕）
- ・閉会の挨拶（国立感染症研究所：木村）

### 研修参加者

＊本報告書では削除

### 研修担当者

小渕 正次（富山県衛生研究所）  
貞升 健志（東京都健康安全研究センター）  
塚越 博之（群馬県衛生環境研究所）  
水越 文徳（栃木県保健環境センター）  
木村 博一（国立感染症研究所）  
長澤 耕男（国立感染症研究所）  
佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）

## グループミーティングシナリオ(第1日目)

A～C班を2分して、最初にグループ討論で昨年度の精度管理調査でうまくいかなかった原因や問題点を抽出する(事前に研修プレゼンファイル配布)。次に、グループ内でトラブルシューティングを作成する(ホワイトボード)。グループ内でまとめたホワイトボードを発表し、全体討論を行ってトラブルシューティングを完成させる。

項目	ポイント	進行
1. 問題点の抽出 (グループ討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・標準曲線は正しく描かれているか →定量値の取り扱い、定量値の持つ意味</li> <li>・作業手順書の流れ図→自分の原因がどのあたりだったのか明示(作業者個人の問題?)</li> <li>・試薬や試料(標準物質)等の保管方法、調製方法、使用方法に問題はないか。</li> <li>・</li> <li>・機器・ピペット等の使用法、管理方法、点検方法のチェック。</li> <li>・問題点を、機材(機器・ピペット)、試薬類(陽性コントロールを含む)、手技の要因に収束できるような進行、まとめ方をする。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・研修プレゼンファイルの発表</li> <li>・ホワイトボードを用いてブレインストーミング形式で討論(小淵、貞升)</li> </ul>
2. トラブルシューティングの作成 (グループ作業 60分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・グループ内で抽出した問題点をについて、トラブルシューティングを作成する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・A4紙に手書きでまとめる(小淵、貞升)→要点ごと(機材、試薬類、手技)</li> </ul>
3. 各グループの発表 (全体討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・復命用に持ち帰りできるトラブルシューティングを目指す。</li> <li>・トラブルシューティングには正解はなく、バラバラか。</li> <li>・職場でのトラブルシューティングないしOJTを補完する目的もある?</li> <li>・検査の質の向上への動機付けと問題解決能力を高める。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・各グループの代表者がスクリーンに映写して発表する(小淵:進行、貞升:記録)。</li> </ul>
4. 総括		
5. 研修後アンケート(1日目)の実		<ul style="list-style-type: none"> <li>・当日実施し、回収する</li> </ul>



ラボ研修シナリオ(第2日目)

A、B班を2分して、ノロウイルスリアルタイムPCRのデモを行い、ピペットの操作方法や陽性コントロールの希釈方法等を習得する(1グループは模範例、他方は失敗例)。また、模範例と失敗例の解析結果を比較し、機材や手技上の問題点が結果にどのように反映されるかを確認する。さらに、リアルタイムPCRの原理や解析法などの基本、機器のメンテナンス等の講義を通してリアルタイムPCRによる遺伝子検出について理解を深める。

項目	ポイント	進行
1. リアルタイムPCRのデモ (グループ見学)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・試薬、試料(陽性コントロール)の取り扱い</li> <li>・ピペットの正しい操作、段階希釈</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・デモンストレーター(塚越、水越)による操作、説明</li> <li>・補足説明(同時進行、木村)</li> <li>・写真撮影、メモ等による記録(小淵、貞升)</li> </ul>
2. リアルタイムPCRについての講義 (講義、全体討論 120分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・リアルタイムPCRの原理、解析、メンテナンス、トラブルシューティングなどの基本を理解させる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・講義(木村)</li> <li>・質疑応答、討論</li> </ul>
3. データ解析 (全体討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・希釈系列調製時の失敗が解析結果にどのように反映されるかを確認する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・デモンストレーターによるデータの解析、説明(塚越、水越)</li> <li>・質疑応答、討論</li> </ul>
4. 総括 (全体 30分)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・2日間の研修のまとめ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・口頭(小淵)</li> </ul>

第 1 日目

13:00～

講師控室

- ・研修についての最終打合せ
- ・配布資料の確認（研修会プログラム、研修プレゼンファイル、グループミーティング・ワークシート、第 1 日目研修後アンケート）

13:30～

講義室（進行：小淵）

- ・開会の挨拶（佐多）
- ・チューターの紹介と参加者の自己紹介（所属と氏名のみ）
- ・研修会のアウトライン説明（小淵）

13:45～

講義室および講師控室（2 グループに分かれる）

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング

1 問題点の抽出（約 50 分：13:45～14:35）

◆参加者の発表とトラブルの列挙（発表 5 分、自由意見 5～10 分）

- \*進行役（貞升、小淵）から発表のポイントを示唆

職場環境→結果確認や OJT の有無

数値→PC の CT 値・R<sup>2</sup> 値

標準曲線→傾き、ばらつき

結果→範囲内か、3 つのうちいくつ判定基準値外か、判定基準値より高い・低い

原因→わからなければ強要しない

再配布 PC のデータ→改善の有無

- \*まず、C 群から発表→発表者の自己診断、その後に参加者全員に自由意見としてその他に気づいたトラブルを出してもらう

- \*各自の発表では質問のみ受付、示唆的なものは可

- \*進行役がホワイトボード（ワークシートのように 3 つのカラムに区切る）に書き止め（重複は記述不要）、参加者はワークシートに自所のトラブルを記入（他所のトラブル等は配布資料にメモ書き）→他所の発表を聞いて自所に当てはまるものはワークシートに追記

2 トラブルシューティングの作成（約 50 分：14:35～15:25）

◆トラブルの原因、対処法の検討

- \*列挙したトラブルについて、考えられる原因、解決のための処置の自由意見を出し合う→間違っても否定しない（後で塚越、水越がコメントして修正すればよい）

- \*問題点の抽出と同様に、進行役がホワイトボード（ワークシートのように 3 つのカラムに区切る）

## 資料 11-c

に書き止め、参加者はワークシートに記入（自所の分）→各自のワークシートの完成を目指す

- \*ブレインストーミングで意見を自由に出し合い、皆で結論を出していく（トラブルを一つずつ解決していく必要はなく、気づいた点はなんでも OK→ホワイトボードをフル活用して自由意見を集める）
- \*塚越、水越両氏は示唆的な質問も含めて議論をリードするが、全ての解答が両氏によることのないように注意する
- \*全体討論（ホワイトボードの発表）に向けて、参考となる図表等を研修プレゼンスライドから選び、コピー&ペーストでスライドを作成する（凝る必要なし）

休憩 15:25～15:40

- \*ホワイトボードの写真撮影による記録（小淵、貞升）

15:40～

### 講義室

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：全体討論

1 各グループの発表（約50分：15:40～16:30、各発表20分・討論5分）

- \*グループミーティングで作成したトラブルシューティング（ホワイトボード）をグループの代表者（A、B群の中から参加者自身で選ぶ）が発表→パワポ（上述のスライド）を併用する
- \*参加者から質問・意見が出なければ、塚越、水越、貞升、小淵が補足

2 トラブルシューティングのまとめ（16:30～16:40、貞升）

- \*2つのホワイトボードをならべ、1つにまとめる→どちらか1つのボードを中心にして他方の重複箇所は見え消し線で消すなど）
- \*色分け（下線や囲み等）で対処法を分類する（トラブルの原因が機材、試薬類、手技の3つに集約されることを示す）
- \*チューターへの意見照会

3 総括（16:40～16:50、小淵）

- \*トラブルシューティング完成版の送付（1か月後）、研究報告書でのデータ使用の承諾をアナウンス
- \*情報交換会のお知らせ

4 研修後アンケート（第1日目）の実施（16:50～17:00）

- \*当日、アンケートを回収する
- \*ホワイトボードの写真撮影による記録（小淵、貞升）

- 参加者には訊いておりませんが、研修終了後に立川駅周辺で情報交換会を行いたいと思います（18:30～20:30）

## 資料 11-c

第 2 日目

9 : 0 0 ~

実習室

・リアルタイム PCR のデモ

◆模範例および手技的失敗例のデモ (GI と GII それぞれの標準曲線のみ、模範例：塚越、失敗例：水越)

\* 2 グループに分かれ (できるだけ前日とは異なる組合せが望ましいが、希望があれば優先)、塚越、水越両氏が説明しながら実演する→手技的なトラブルの確認

\* デモ中に補足説明 (木村)

\* メモや写真撮影による記録 (小淵、貞升)

\* 時間に余裕があれば、個々に質疑応答や実際に微量ピペッターの扱いや希釈法を体験する

1 0 : 3 0 ~

講義室

・リアルタイム PCR 基礎講座 (木村)

\* リアルタイム PCR の原理や解析方法の基本、機器のメンテナンス、試薬等の保存方法に関する講義を通して参加者の理解を深める

\* 質疑応答、補足等

昼食 1 2 : 0 0 ~ 1 3 : 0 0

\* 実習プレゼン用のスライドに結果を貼付ける (塚越、水越)

\* スライドを配布資料用にプリントアウト

1 3 : 0 0 ~

講義室

1 結果の解説および討論 (1 3 : 0 0 ~ 1 4 : 0 0、水越)

\* 合わせて、事前検討のデータも紹介する

\* 質疑応答、木村、塚越、貞升、小淵の追加コメント

2 総括 (1 4 : 0 0 ~ 1 4 : 3 0、小淵)

\* 研修全体を通しての参加者の感想およびチューターの寸評

\* 事務連絡等

3 閉会の挨拶 (木村)