

平成 29 年度外部精度管理事業  
課題 1 インフルエンザウイルス

実施手順書  
(配布パネル検体の測定方法)

- 1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドアウンを行ってから 500 マイクロリットルの滅菌蒸留水を加え、室温で 2 分間静置して下さい。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、また液面が泡立つぐらいに激しくシェイクする)を行い、サンプルが完全に溶解した事を確認して下さい。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-70℃以下にて保管して下さい。)
- 2) 各参加施設の検査方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い、核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)により型・亜型同定を行って下さい。パネル検体は「A/H5 や A/H7 亜型などの鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴があり、かつ鳥との接触歴がある複数の患者から採取された検体」という前提で検査を行って下さい。なお B 型インフルエンザウイルスの検査は、今回は評価対象外となりますので、検査を実施しなくても構いません。
- 3) 使用後のパネル検体は臨床検体に準じて廃棄して下さい。
- 4) 全ての検査終了後、結果入力ファイル(Excel ファイル)の「結果入力シート」内の各事項を記入して下さい。Ct(Cp)値は小数第 1 位まで算出して、「結果入力シート」の「Ct(Cp)値」欄に記入して下さい(記入方法は「結果入力シート\_入力例」を参考にして下さい)。「結果入力シート」をもとに判定した各パネル検体に対する総合判定結果を「総合判定結果入力シート」に記入して下さい。また、総合判定に利用した方法(コンベンショナル RT-PCR 法、RT-LAMP 法、シーケンス法、その他)で該当するものに「○」を「判定方法」欄に記入して下さい。総合判定に至るのに行った検査回数を記入してください。
- 5) 平成 29 年 9 月 1 日までに、外部精度管理事業ホームページ(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/reference/eqa.html>) に記載の結果入力専用サイト上で、結果入力ファイルに記載した内容を記入して下さい。

(備考)

結果入力ファイルには結果入力シートを 4 回分収載しています。ウェブ上の結果入力専用サイトでは、4回分までの結果入力シートの内容が入力できます。検査を 5 回以上行った場合は、「結果入力シート」の「備考」欄にその旨を明記し、「結果入力シート(1 回目)」をコピーして 5 回目以降の結果等を入力して(シート名およびタイトルに検査の回数を追記して下さい[例「結果入力シート(5 回目)」])、結果入力専用サイトの指示に従って結果入力ファイルをアップロードして下さい。

結果報告の締め切りに間に合わないと見込まれる場合は、事前に事務局に連絡をお願いします。事前に連絡がなく、締め切りを過ぎた場合については、評価を行いません。

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下さい。

国立感染症研究所(戸山庁舎)  
外部精度管理事業 事務局  
TEL 03-5285-1111(内線 2301)  
FAX 03-5285-1175  
E-mail: eqa@niid.go.jp

平成 29 年度 外部精度管理事業（課題 1）で実施したインフルエンザウイルスの核酸検出検査（リアルタイム RT-PCR 法）の結果集計とトラブルシューティングについて

国立感染症研究所で公開している「インフルエンザ診断マニュアル(第 2, 3 版)」、「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)、H1pdm、H3、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、高感度かつ特異的に検出できるように最適化されており、弊所の環境で一定の検出感度・特異性を有している事を確認しています。しかしながら、使用している機器の違い、機器のメンテナンス状況、試薬等の保管状況、検査手技の習熟度、検査手順の違いなど、それぞれ検査を行う環境は各所で異なります。そこで各所が実施する検査の信頼性を高めるためには、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、内部精度管理だけでなく外部精度管理により検査精度を評価することが重要となります。

平成 29 年度 外部精度管理事業課題 1（以下、本事業）では、RNA 抽出および各リアルタイム RT-PCR 検査系などに問題がなければ、A 型インフルエンザウイルスと各亜型を同定可能な 5 検体(検体 A～E)と 1 検体の陰性検体(検体 F)を配布しました(検体と検体番号の内訳は表 1 を参照)。従って陰性検体を除いた 5 検体の全てで型・亜型同定ができない場合は、RNA 抽出あるいは検査系などに何らかの問題が生じていたと考えられます。

表 1 各検体に対する各所で実施した検査結果のまとめ(施設数で集計)

| 検体 | 検体番号の<br>100 の位 | 型/亜型             | 濃度<br>(copies/ $\mu$ L)* | 施設数**                  |                               |
|----|-----------------|------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------------|
|    |                 |                  |                          | 型・亜型の両方を<br>正しく同定(正答率) | その他                           |
| A  | 1 もしくは 7        | A(H1N1)<br>pdm09 | 50                       | 71/72<br>(99%)         | A/H1pdm, H3 混合 : 1            |
| B  | 2 もしくは 8        | A(H3N2)          | 50                       | 71/72<br>(99%)         | A 型亜型不明 : 1                   |
| C  | 3 もしくは 9        | A(H5N1)          | 50                       | 72/72<br>(100%)        |                               |
| D  | 4 もしくは 0        | A(H7N9)          | 50                       | 72/72<br>(100%)        |                               |
| E  | 5               | A(H7N9)          | 5                        | 70/72<br>(97%)         | A 型亜型不明 : 1<br>陰性(検出限界以下) : 1 |
| F  | 6               | 陰性(検出<br>限界以下)   |                          | 72/72<br>(100%)        |                               |

\* 配布した乾燥検体を 500 $\mu$ L の水に溶解した時のおよその M 遺伝子 RNA 濃度

\*\* 総合判定結果を集計

E の検体は、500 $\mu$ L の水に溶解した時の M 遺伝子の RNA 濃度は 5 copies/ $\mu$ L で、仮に 140 $\mu$ L の検体から RNA 抽出(溶出量 60 $\mu$ L)を行うと、理論上 RNA 抽出液中の RNA 濃度は約 11.7

copies/ $\mu\text{L}$ になります(RNA抽出効率が100%と仮定)。5 $\mu\text{L}$ のRNA抽出液をテンプレートにしてリアルタイムRT-PCR反応を実施した場合、1反応あたりのテンプレートRNAは約58.3copiesになります。一般的にリアルタイムRT-PCR反応の検出限界は5copies前後なので、RNA抽出およびリアルタイムRT-PCR検査系などに問題がなければ、これらの検体の型・亜型は必ず同定することができます(添付資料1「検査結果の確認方法について」図1参照)。従って陰性検体を除いた5検体のうち1つでも型・亜型同定ができなかった場合は、RNA抽出もしくはリアルタイムRT-PCR検査系などに何らかの問題があったと考えられます。

また、500 $\mu\text{L}$ の水に溶解した時のM遺伝子のRNA濃度が50copies/ $\mu\text{L}$ であるA~Dの検体のRNA抽出(140 $\mu\text{L}$ の検体から60 $\mu\text{L}$ の溶出量でRNA抽出を行った場合)後のRNA濃度は約117copies/ $\mu\text{L}$ (RNA抽出効率が100%と仮定)になり、5 $\mu\text{L}$ のRNA抽出液をテンプレートにしてリアルタイムRT-PCRを実施した場合、1反応あたりのテンプレートRNAは約583copiesになります。このコピー数は定量的検出(同じものを複数回検査してもCt(Cp)値は変わらない)が可能なRNA量なので、理論上Type AのCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数は、これら全ての検体でほぼ同じ値になります(添付資料1「検査結果の確認方法について」図2参照)。

参考までに、各所が算出した検体A~DにおけるType AのCt(Cp)値の最大値と最小値の差を求め、分布図として添付資料1「検査結果の確認方法について」図3に示しました。理論上、同じ値になるType AのCt(Cp)にばらつきがないかどうか、各所の値と比較するなどして確認してみてください。

また、Type A検出系と各亜型検出系に問題がなければ、検体A~DにおけるType Aと各亜型検出系のCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数も理論上ほぼ同じ値(1.5くらいまでの差は許容範囲内)になります(添付資料1「検査結果の確認方法について」図4参照)。これらの検体でType Aと各亜型検出系のCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数の差が2以上ある場合は、Ct(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数が大きい方の検出系の検出精度が悪くなっていたと考えられます。

参考までに、各所が算出した検体A~DのType Aと各亜型のCt(Cp)値の差(Type A - 各亜型)を求め、分布図として添付資料1「検査結果の確認方法について」図5に示しました。各所の値と比較するなどしてType Aと各亜型の検出感度に差がないかどうか確認してみてください。

さらに、他施設が算出した各検体に対するType Aおよび各HA亜型検出系のCt(Cp)値を知るための資料として、参考までに各所で算出されたCt(Cp)値の分布図を添付資料2「各所で算出したCt値分布」に示した。ベースライン(Threshold line)を全所で一律に揃えるなどして補正したCt(Cp)値ではなく、各所より報告のあったCt(Cp)値をそのまま集計したものとしますのでご留意下さい。

本事業では6検体全てでRNA抽出を行っていただきましたが、何らかの原因でRNA抽出の効率が悪くなった検体はType Aと各亜型検出系のCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数の値が全体的に大きくなる、あるいはシグナルが確認できなくなります。他にも、リアルタイムRT-PCR検査を実施する際に、機器、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査

手技や検査手順に何らかの問題があれば、検出感度や特異性の低下、コンタミネーションや非特異反応が起こるなどして、精度の高い検査を行うことができなくなります。

参考までに総合判定結果を得るまでに実施した各検体に対する検査回数の集計および各検体に対する延べ検査回数(Type A と各 HA 亜型)を表 2 に示します。

表 2 各検体に対する検査回数の集計および各検体に対する延べ検査回数

| 検体 | 検体番号の<br>100 の位 | 型/亜型             | 施設数         |             |               | のべ検査回数* |       |
|----|-----------------|------------------|-------------|-------------|---------------|---------|-------|
|    |                 |                  | 検査回数<br>1 回 | 検査回数<br>2 回 | 検査回数<br>3 回以上 | Type A  | HA 亜型 |
| A  | 1 もしくは 7        | A(H1N1)<br>pdm09 | 46          | 14          | 12            | 112     | 106   |
| B  | 2 もしくは 8        | A(H3N2)          | 45          | 16          | 11            | 110     | 105   |
| C  | 3 もしくは 9        | A(H5N1)          | 47          | 12          | 13            | 109     | 110   |
| D  | 4 もしくは 0        | A(H7N9)          | 47          | 12          | 13            | 110     | 110   |
| E  | 5               | A(H7N9)          | 47          | 12          | 13            | 103     | 106   |
| F  | 6               | 陰性(検出<br>限界以下)   | 45          | 13          | 14            | 115**   |       |

\* Ct 値が算出された検査回数

\*\* 「陰性(検出限界以下)」もしくは、「その他 (判定保留)」の記載を合計

各所においては、実施した検査結果に問題がないかどうか、本解説書、添付資料 1「検査結果の確認方法について」、添付資料 3「精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」を参考に確認を行って下さい。問題が見つかった場合は、添付資料 3 や添付資料 4「トラブルシューティング時のフローチャート」を参考に、各所においてトラブルシューティングを実施して下さい。

本事業の結果に関してご不明な点やご意見などがございましたら、下記にお問い合わせ下さい。また、トラブルシューティングを実施する際に比較対照となるプローブ、プライマーが必要な際は、少量であれば弊所で使用しているものを分与する事が可能です。ご希望の場合も下記にお問い合わせ下さい。

本事業に対する問い合わせ先

外部精度管理事業 事務局 [eqa@niid.go.jp](mailto:eqa@niid.go.jp)

## 検査結果の確認方法について

| 検体                  | A             | B            | C            | D            | E    | F              |  |
|---------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|------|----------------|--|
| 濃度(copies/ $\mu$ L) | 50            | 50           | 50           | 50           | 5    | -              |  |
| 検体番号                | x1xx<br>x7xx  | x2xx<br>x8xx | x3xx<br>x9xx | x4xx<br>x0xx | x5xx | x6xx           |  |
| 検査結果                | A/H1pdm       | A/H3         | A/H5         | A/H7         | A/H7 | 陰性<br>(検出限界以下) |  |
| Ct(Cp)値             | Type A (M遺伝子) | 32.2         | 32.1         | 32.1         | 31.8 | 35.5           |  |
|                     | H1pdm09       | 33.1         |              |              |      |                |  |
|                     | H3            |              | 30.8         |              |      |                |  |
|                     | H5            |              |              | 32.5         |      |                |  |
|                     | H7            |              |              |              | 31.0 | 34.0           |  |
|                     | その他           |              |              |              |      |                |  |

検体x5xxは、500 $\mu$ Lの水に溶解した時のM遺伝子のRNA濃度は5 copies/ $\mu$ Lである。140 $\mu$ Lの検体からRNA抽出(溶出量60 $\mu$ L)を行うと、RNA抽出液中のRNA濃度は約11.7 copies/ $\mu$ Lとなる(RNA抽出効率が100%と仮定)。

このうち、5 $\mu$ LのRNA抽出液をテンプレートにしてリアルタイムRT-PCR反応を実施した場合、1反応あたりのテンプレートRNAは約58.3 copiesとなる。

RNA抽出およびリアルタイムRT-PCR反応などに問題がなければ、これらの検体の型・亜型は必ず同定できる。

図1. 5 copies/ $\mu$ Lの検体は各検出系検出限界よりも濃いテンプレートRNAが含まれているため必ず検出できる

| 検体                  | A             | B            | C            | D            | E    | F              |  |
|---------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|------|----------------|--|
| 濃度(copies/ $\mu$ L) | 50            | 50           | 50           | 50           | 5    | -              |  |
| 検体番号                | x1xx<br>x7xx  | x2xx<br>x8xx | x3xx<br>x9xx | x4xx<br>x0xx | x5xx | x6xx           |  |
| 検査結果                | A/H1pdm       | A/H3         | A/H5         | A/H7         | A/H7 | 陰性<br>(検出限界以下) |  |
| Ct(Cp)値             | Type A (M遺伝子) | 32.2         | 32.1         | 32.1         | 31.8 | 35.5           |  |
|                     | H1pdm09       | 33.1         |              |              |      |                |  |
|                     | H3            |              | 30.8         |              |      |                |  |
|                     | H5            |              |              | 32.5         |      |                |  |
|                     | H7            |              |              |              | 31.0 | 34.0           |  |
|                     | その他           |              |              |              |      |                |  |

検体A~Dは、500 $\mu$ Lの水に溶解した時のM遺伝子のRNA濃度は50 copies/ $\mu$ Lである。140 $\mu$ Lの検体からRNA抽出(溶出量60 $\mu$ L)を行うと、RNA抽出液中のRNA濃度は約117 copies/ $\mu$ Lとなる(RNA抽出効率が100%と仮定)。

このうち、5 $\mu$ LのRNA抽出液をテンプレートにしてリアルタイムRT-PCR反応を実施した場合、1反応あたりのテンプレートRNAは約583 copiesとなる。

RNA抽出およびリアルタイムRT-PCR反応などに問題がなければ、これらの検体のType AのCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数は、理論上これら全ての検体では同じ値になる。

参考までに、各所が算出したこれらType A Ct(Cp)値のうち最大値と最小値の差を求め、分布図として図3に示した。

図2. 50 copies/ $\mu$ Lの検体のType AのCt(Cp)値はほとんど同じ値になる

### Type A Ct(Cp)値(最大値-最小値) 差の分布図

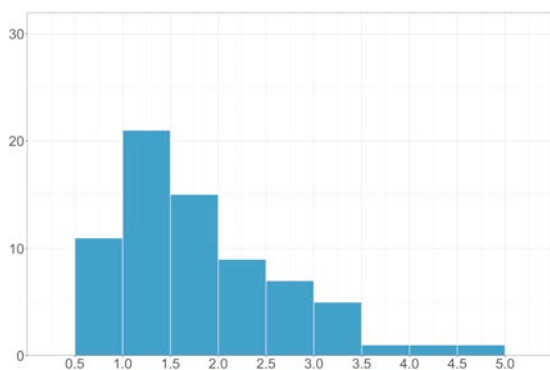


図3. 各所が算出した濃度が50 copies/ $\mu$ Lの検体(A~D)のType A Ct(Cp)値の最大値と最小値の差の分布図 (図2の例の場合は、32.2(最大値)-31.8(最小値)=0.3となり、0~0.5(0より大きく0.5以下)にプロットされる。)

| 検体                  | A                | B            | C            | D            | E    | F              |
|---------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|------|----------------|
| 濃度(copies/ $\mu$ L) | 50               | 50           | 50           | 50           | 5    | -              |
| 検体番号                | x1xx<br>x7xx     | x2xx<br>x8xx | x3xx<br>x9xx | x4xx<br>x0xx | x5xx | x6xx           |
| 検査結果                | A/H1pdm          | A/H3         | A/H5         | A/H7         | A/H7 | 陰性<br>(検出限界以下) |
| Ct(Cp)値             | Type A<br>(M遺伝子) | 32.2         | 32.1         | 32.1         | 31.8 | 35.5           |
|                     | H1pdm09          | 33.1         |              |              |      |                |
|                     | H3               |              | 30.8         |              |      |                |
|                     | H5               |              |              | 32.5         |      |                |
|                     | H7               |              |              |              | 31.0 | 34.0           |
|                     | その他              |              |              |              |      |                |

検体A～Dは、500 $\mu$ Lの水に溶解した時のM遺伝子のRNA濃度は50 copies/ $\mu$ Lである。140 $\mu$ Lの検体からRNA抽出(溶出量60 $\mu$ L)を行うと、RNA抽出液中のRNA濃度は約117 copies/ $\mu$ Lとなる(RNA抽出効率が100%と仮定)。

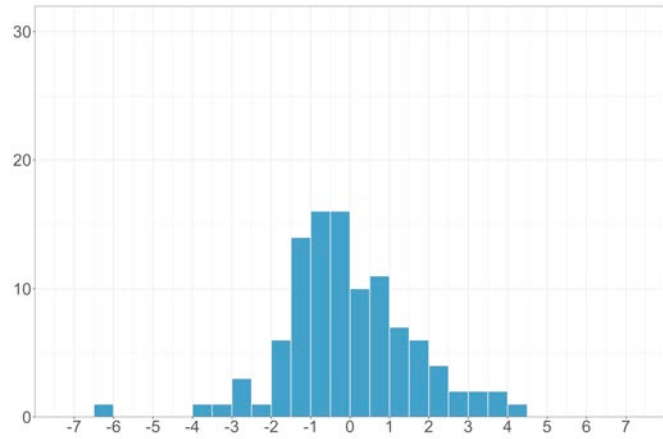
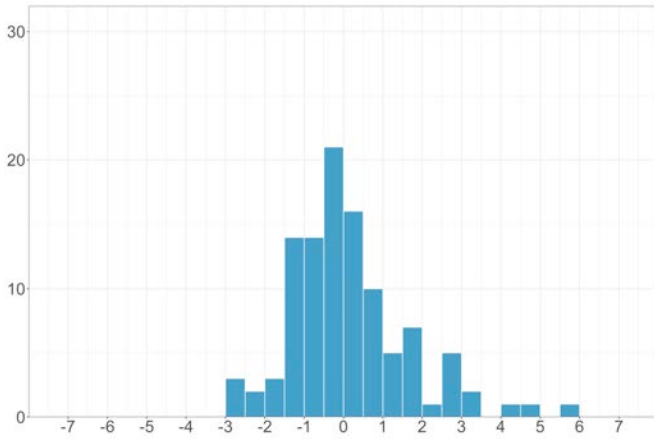
このうち、5 $\mu$ LのRNA抽出液をテンプレートにしてリアルタイムRT-PCR反応を実施した場合、1反応あたりのテンプレートRNAは583 copiesとなる。

RNA抽出およびリアルタイムRT-PCR反応などに問題がなければ、これら各検体のType Aと各亜型検出系のCt(Cp)値もしくは立ち上がりサイクル数は理論上ほぼ同じ値(1.5くらいまでのずれは許容範囲内)になる。

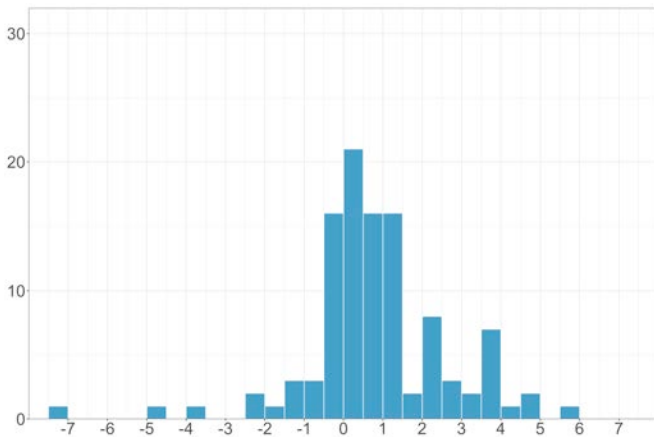
参考までに、各所が算出したこれら検体のType Aと各亜型のCt(Cp)値の差(Type A - 各亜型)を求め、分布図として図5に示した。

図4. 50 copies/ $\mu$ Lの検体のType Aと各HA亜型のCt(Cp)値はほとんど同じ値になる

## 検体A (x1xx, x7xx) (A/H1pdm09) 検体B (x2xx, x8xx) (A/H3)



## 検体C (x3xx, x9xx) (A/H5)



## 検体D (x4xx, x0xx) (A/H7)

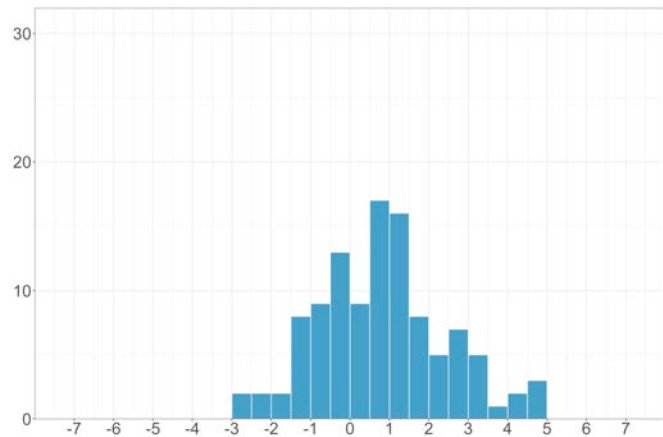


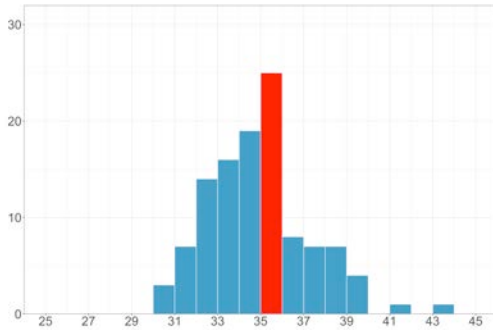
図5.各所が算出した濃度が50 copies/ $\mu$ Lの検体(A～D)のType Aと各HA亜型のCt(Cp)値の差(Type A - 各亜型)の分布図 (例えば図4のA/H1pdmの場合、32.2(TypeA)-33.1(H1pdm09)=-0.9となり、-1～-0.5(-1より大きく-0.5以下にプロットされる。)

## Ct(Cp)値の分布について

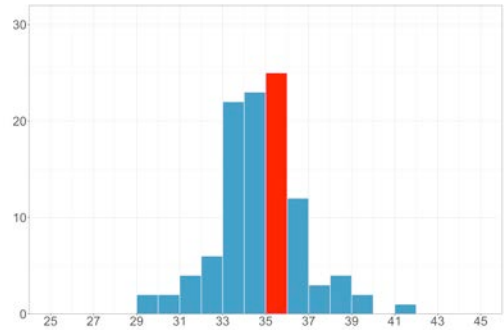
参考までに各所で算出された各検体に対するType Aおよび各HA亜型検出系のCt(Cp)値の分布を示します(例えば、35.0は34.0~35.0(34.0より大きく35.0以下)の範囲となります)

濃度が50 copies/ $\mu$ Lの検体A(x1xx, x7xx)、B(x2xx, x8xx)、C(x3xx, x9xx)、D(x4xx, x0xx)の場合、最も報告数の多かったCt(Cp)値の分布範囲は、Type Aは35.0~36.0(検体A)、33.0~34.0(検体Bおよび検体D)、34.0~35.0(検体C)、H1pdm09 HAは35.0~36.0(検体A)、H3 HAは33.0~34.0(検体B)、H5 HAは34.0~35.0(検体C)、H7 HAは32.0~33.0(検体D)でした。

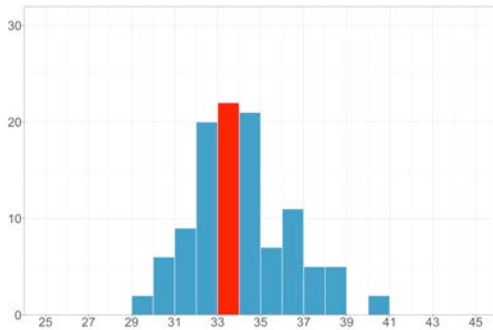
検体A (x1xx, x7xx) TypeA(M遺伝子)



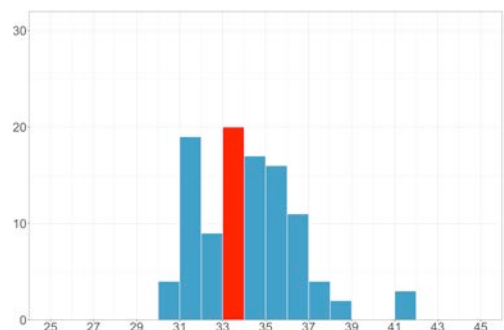
検体A (x1xx, x7xx) H1pdm09



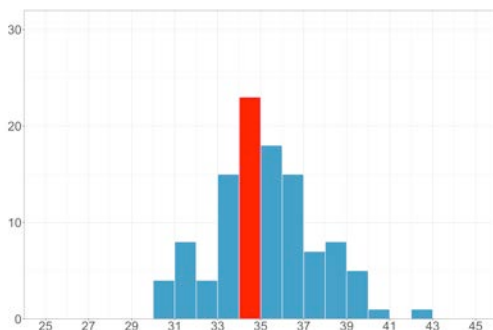
検体B (x2xx, x8xx) TypeA(M遺伝子)



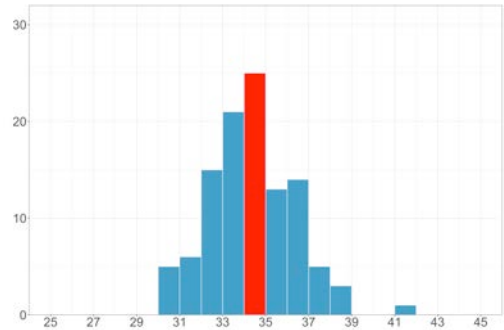
検体B (x2xx, x8xx) H3



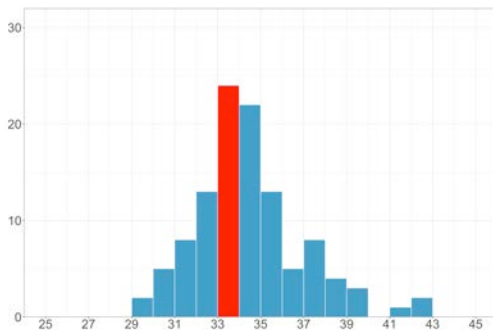
検体C (x3xx, x9xx) TypeA(M遺伝子)



検体C (x3xx, x9xx) H5



検体D (x4xx, x0xx) TypeA(M遺伝子)



検体D (x4xx, x0xx) H7

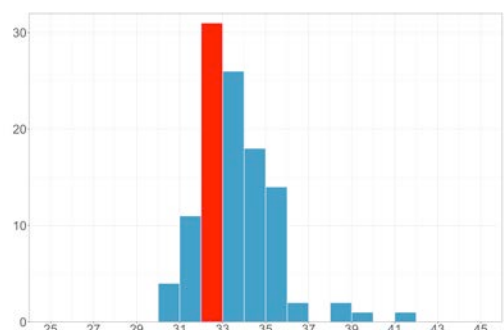


図1. 濃度が50 copies/ $\mu$ Lの検体に対して各所で算出した各検出系 Ct(Cp)値の分布図

濃度が5 copies/ $\mu$ Lの検体E(x5xx)については、RNA抽出後のテンプレートRNAの濃度が定量的検出できない濃度になっていた可能性が高いにも関わらず、分布範囲はそれほど広くなく、最も報告数の多かったCt(Cp)値の分布範囲は、Type Aで38.0~39.0、H7 HAで36.0~37.0でした。

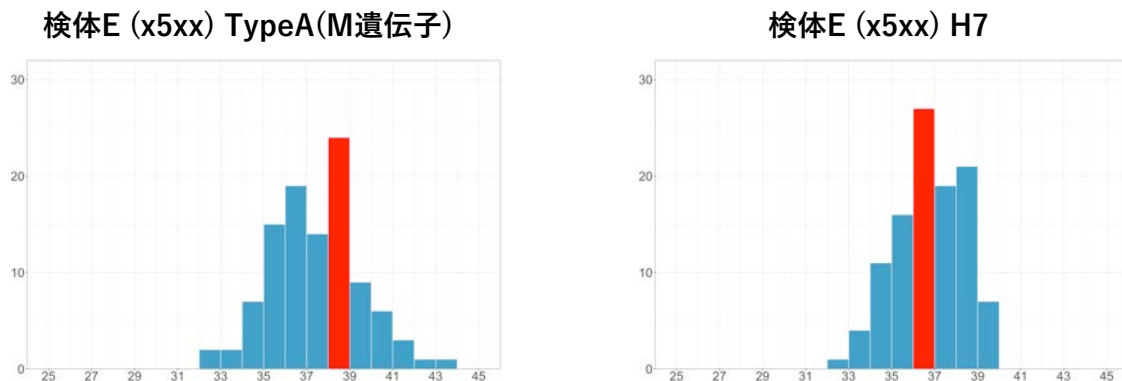


図2. 濃度が5 copies/ $\mu$ Lの検体に対して各所で算出した各検出系 Ct(Cp)値の分布図

なお、今回はあくまでも、各所で算出されたCt(Cp)値を集計して散布図に示しただけであり、各所の報告データに対して、ベースライン(Threshold line)を揃えるなどして補正したCt(Cp)値ではない事にご留意下さい。

一般的にベースラインを上げるとCt(Cp)値は大きくなるように、ベースラインの設定値の違いによりCt(Cp)値は変化します。同じ測定機器で同一の検体を複数回測定しても、ベースラインを算出するためのバックグラウンドの蛍光値が毎回全く同じにはならないため、検体のCt(Cp)値も毎回全く同じ値に算出されるとは限りません。測定する機器が異なる場合も同様です。また、Ct(Cp)値の算出方法は機器やアプリケーションにより異なります。つまり、一つの機器で同時測定により算出されたCt(Cp)値については各値間で相関性がありますが、それ以外の場合は各値間の相関性はありません。

今回、他施設が算出した各検体に対するType Aおよび各HA亜型検出系のCt(Cp)値を知るための資料として、各所で算出されたCt(Cp)値の分布図を参考までに提示しましたが、各所のCt(Cp)値は各所の条件で算出されており、他所のCt(Cp)値との相関性はありませんので留意下さい。



## 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて

### 精度管理について

#### 1. 定量的 RT-PCR における 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)。また一部の機器においては他の解析方法を用いていることもあります。その 1 つに、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)値等として算出(2nd Derivative Maximum 法)する解析方法があり、この場合、Threshold Line は存在しません(図 2)。

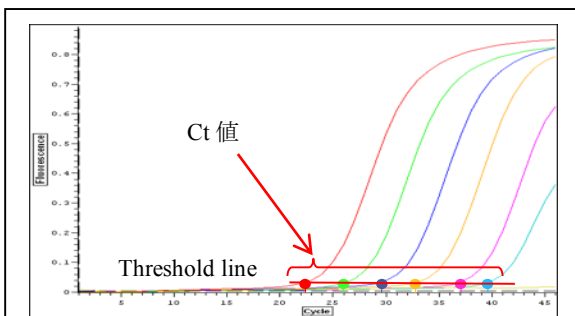


図 1 Threshold line と交差する  
時点のサイクル数を算出

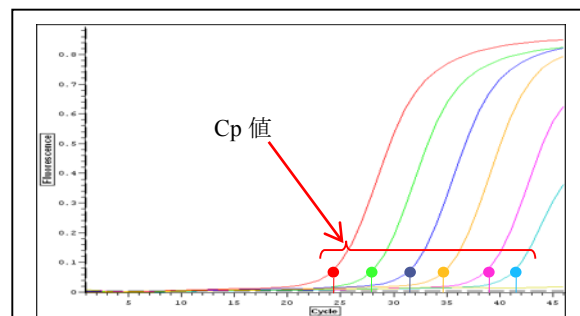


図 2 2nd Derivative Maximum 法  
により算出

リアルタイム RT-PCR 法において機器、反応試薬、プライマー、プローブ、手技、手順に問題がなければ、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： $2^{3.32} \div 10$ )の直線上に Ct(Cp)値がプロットされます(図 3)。

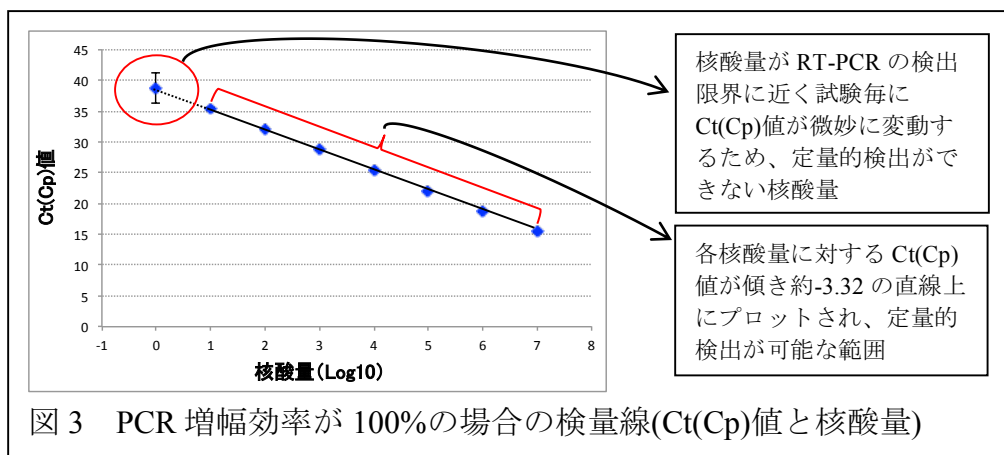


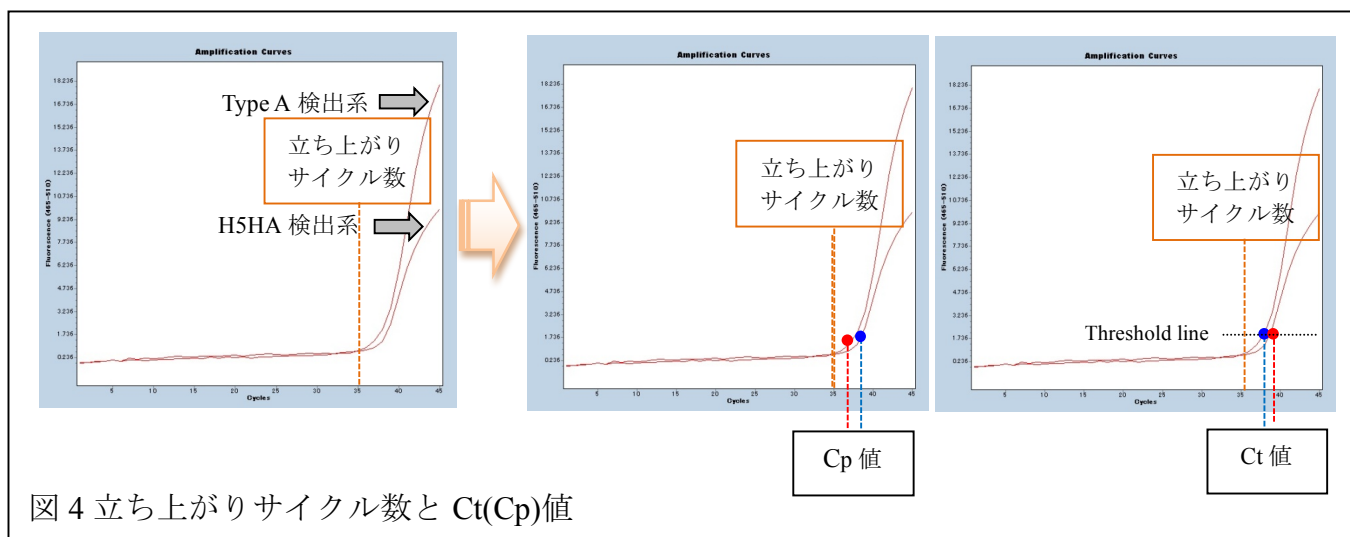
図 3 PCR 増幅効率が 100%の場合の検量線(Ct(Cp)値と核酸量)

### (添付資料 3)

## 2.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、標的となる各遺伝子のコピー数が同じ場合は、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に各遺伝子検出系の設計をしているので、検査系に問題がなければ、どの検出系でもコピー数が同じ場合はシグナルの立ち上がりサイクル数はほぼ同じになります。しかし Ct(Cp)値については立ち上がりサイクル数とは少し異なる場合があります。それぞれの検出系間でその値が若干乖離する場合があります。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り、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)値は異なる事があるためです。図 4 は同濃度の核酸量に対する Type A と H5 検出系の波形ですが、Type A と H5 の立ち上がりサイクル数がほとんど同じであっても、Ct(Cp)値は少し乖離した値を示します。

従って結果解析を行う際は、Ct(Cp)値の確認だけではなく、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が重要となります。



## 3.検出系に何らかの問題がある場合

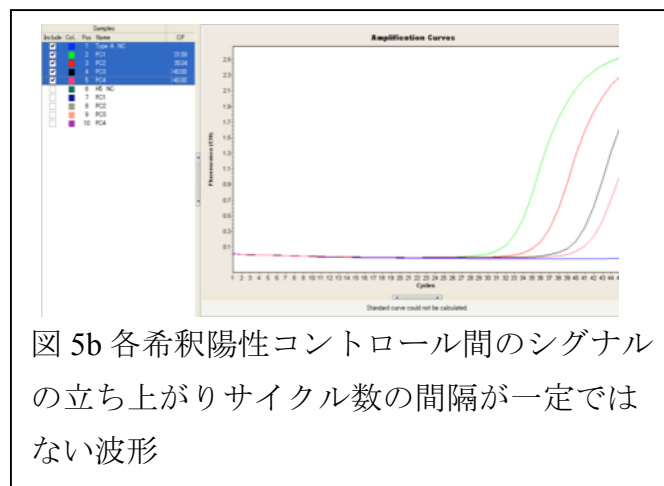
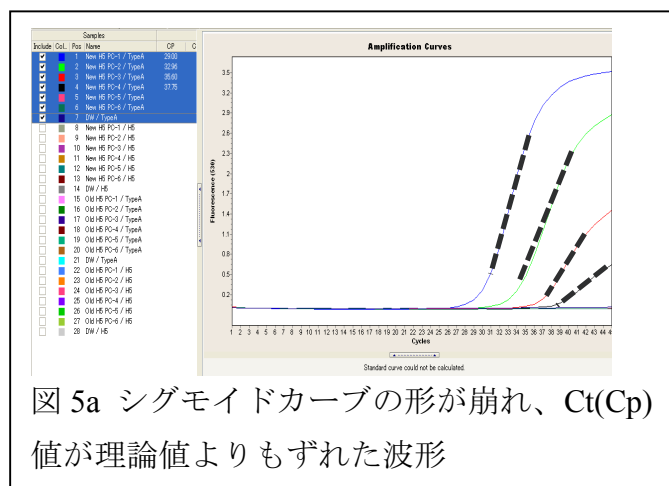
H5 および H7 陽性コントロール(識別マーカー入り)に含まれる Type A (M 遺伝子)および各 HA 遺伝子のコピー数は、同じ濃度になるように調製して各所に配布しています。検査が問題なく行われた場合、陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Type A 検出系と HA(H5 もしくは H7)検出系の立ち上がりのサイクル数はほぼ同じサイクル数となるはずですが、なお、Roche LightCycler480 システムの場合では、第 2 項に記載した理由により、Type A と HA 検出系の Cp 値は 0.5~1.5 程度乖離します(特にテンプレート RNA の濃度が薄い時に Type A の方が少し Cp 値は大きくなる傾向があります)。

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)値の間隔は等間隔となり、効率よく PCR 増幅反応が進んだ場合は、検出系に関係なく概ね 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)。

### (添付資料 3)

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、など検出系に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、試薬調製時の混合が不十分で反応試薬が均一になっていない場合や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場合など、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、値が大きい方の検出系に何らかの問題(検査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は、その検出系に何らかの問題が起きている可能性を考えます。

## 4. 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を以前の結果と比較するなど、精度管理を意識した継続的な確認が重要となります。検出系に何らかの問題が生じている場合、こうした確認により原因を明らかにできる場合もあり、その場合は直ちにトラブルシューティングを実施することで、以降の検査精度を維持する事が可能となります。

### 検査系に問題があった場合、予想される原因とトラブルシューティングの方法

A. 波形が全体的に汚い。再現性が低い(検査毎に、また作業員により異なる結果が出る、波形が乱れ Ct(Cp)値がばらつく場合)

原因 1: 機器、解析方法に問題がある

### (添付資料 3)

#### トラブルシューティングの方法

リアルタイム RT-PCR 反応に使用する機器は、定期的なメンテナンスやキャリブレーションの実施が必要です。まずは機器のメンテナンス状況を確認し、必要であれば機器のメンテナンスやキャリブレーションの実施を検討して下さい。また解析方法に問題が無いか(特にベースラインが低すぎる事はないか)どうかを確認し、必要であれば解析方法を検査毎に統一(例えば Threshold line はいつも決まった値を使用するなど)して検査・解析を行うことをお勧めします。

#### 原因 2: 試薬調整の過程(検査手技が未習熟、微量ピペッター等の不備なども含む)に問題がある

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チューブ毎に異なる事となり、また、検査毎にこれらの濃度がばらついて、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チューブ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て、同じ検体であっても検査毎に Ct(Cp)値が大きく変動するなど、再現性のない正確性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工事調整している場合は、極少量のプライマーやプローブを分取・分注することになるため、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ばらつき、同じ検体であっても検査結果が異なる再現性のない検査になってしまう可能性があります。

また、複数のリアルタイム PCR 機器(同機種)を使用して同一検体を検査した場合、各機器で異なる Ct(Cp)値となる場合がありますが、同じ Threshold Line を設定して解析を行えば、同一検体の場合は、毎回ほぼ同じ Ct(Cp)値を得ることができます。

#### トラブルシューティングの方法

- プライマー/プローブミックスをあらかじめ作製し、小分け分注にて冷凍保管(自動霜取り機能のないフリーザーを使用する。できれば-70度以下での保管を推奨します)し、検査時には小分け分注分を使い切りで使用する。
- 試薬調製時は、たとえ少ないサンプル数でも、反応チューブ毎に調製するのではなく、共通の反応試薬はまとめて作製してそれを分注することで、微量な分取が必要な酵素等の試薬分取・分注誤差が少なくなり、検査結果のばらつきを抑えることができます。

### (添付資料 3)

- リアルタイム RT-PCR 反応等の遺伝子検査で、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も小さく、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すると、正確性に欠けた検査になってしまうので、微量ピペッターの精度を保つための点検を定期的に行う
  - ✓ 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手順や使用する微量ピペッターが各人で異なる場合は、標準業務(作業)手順書を作成するなどして、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、作業手順や機材等の統一・共通化を図る

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、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していないかどうかを確認するという方法があります。検査手技が未熟な場合や微量ピペッターなどに不備があると、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界などが検査毎に変化します。改善すべき原因が複数あると検査の精度管理が難しくなります。まずは各人が検査手技を習熟し、検査精度に関する意識向上に努める事が重要になります。

### B. 全ての検出系が遅れる。(全体的に感度が悪い)

#### 原因：反応試薬、RNA 抽出試薬等に問題がある

過去の結果と比べると Ct(Cp)値が大きい、10 倍階段希釈した陽性コントロールが  $10^3$  希釈液まで陽性にならない、などの場合は反応試薬(プライマー・プローブも含まれる)の劣化が疑われます。また、10 倍階段希釈した全ての陽性コントロールが  $10^3$  希釈液まで陽性になるにも関わらず、RNA 抽出をした検体の Ct(Cp)値が全体的に大きくなる、もしくは検出できなくなる傾向が強まった、などの場合は RNA 抽出試薬等に問題がある可能性があります。その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 凍結保存が必要な試薬類(キャリア RNA など)の凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による試薬類の経年劣化(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、頻回な扉の開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受けやすい場合など)
- 3) 品質保証期限を過ぎた試薬やキットを使用している場合

#### トラブルシューティングの方法

試薬類(キットを構成するカラム等を含む)は品質保証期限内のものを使用して下さい。品質保証期限内であっても劣化が疑われる場合は、新しい試薬と古い試薬とで比較検討するなどし、

### (添付資料 3)

劣化していない事を確認した試薬のみを使用するようにして下さい。

- 反応試薬(酵素・バッファー類)に問題があると考えられる場合、新しい試薬の分注品と使用中の分注品の両方を並べて比較検討し、使用中の試薬の劣化が確認できた場合は、使用中の分注品を破棄して、新しい反応試薬を使用するようにして下さい。
- 反応試薬を新しくしても改善できない場合は、プライマー、プローブの劣化や、陽性コントロールの劣化により、検出系に問題が生じた可能性を疑い、後述の C 項、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。
- RNA 抽出試薬に問題があると考えられる場合、新旧両方の試薬で抽出した検体を 1 つの検出系にて並べて比較検討し、使用中の RNA 抽出試薬の劣化が確認できた場合は破棄して、新しい RNA 抽出試薬を使用するようにして下さい。

なお、新たな試薬類を保管する際は、試薬類の劣化が進まないように対策を講じて下さい(例：凍結融解の繰り返しを避けるため試薬類を小分け分注して使い切りにする、自動霜取り機能のついていない冷凍庫に保管する、扉の開閉による温度変化の影響が少ない場所に保管する、など)。

C. 特定の陽性コントロールの結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない、もしくは、Ct(Cp)値が過去の結果より大きくなった。

**原因：**特定の陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある

このようなケースでは、 $10^3$  希釈液まで陽性とならなかった陽性コントロールの劣化が疑われ、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 陽性コントロール(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(陽性コントロールは RNA なので、マスターストック、ワーキングストック共に  $-70$  度以下で保存して下さい。希釈した陽性コントロールは長期保管できません。また、陽性コントロールは  $-20$  度での長期保管、自動霜取り機能の付いた冷凍庫での保管、扉開閉の多い冷凍庫(温度変化が頻繁)での保管で劣化が進みやすい)
- 3) 陽性コントロールのワーキングストックを作製する際の希釈系列作製が不正確

なお、特定の検出系のみ陽性コントロールの 10 倍階段希釈が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない場合は、その検出系のプライマー、プローブの劣化も疑われるので、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。

#### トラブルシューティングの方法

- 劣化が疑われる陽性コントロールについて、マスターストックを希釈してワーキングストックを作製します。新旧両方の陽性コントロールを並べて比較検討し、古い陽性コントロールの劣化を確認した場合は直ちに破棄して、新たに作製したワーキングストックに更新して下さい。
- ワーキングストックを更新しても改善が見られない場合は、マスターストックの劣化が疑われるので、陽性コントロールのマスターストックを更新して下さい。H5 および H7 陽性コン

### (添付資料 3)

トロールの再分与を希望する場合は、感染研にお問い合わせ下さい。

なお、比較検討する際の反応試薬等は、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するようにして下さい。また、新たに陽性コントロールのワーキングストック、マスターストックを保管する際は、劣化が進ま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、など)。

#### D. 特定の検出系において全体的に Ct(Cp)値が乖離する(遅れる)

##### 原因 1：特定の検出系のプライマー、プローブに問題がある

このようなケースではシグナルの立ち上がりサイクル数に遅れが生じている検出系(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)に何らかの問題があり、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が凍結融解の繰り返しにより劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(4 度で冷蔵保管した場合、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長期に保管した場合、頻回な扉開閉により冷凍庫内の温度変化の影響を受けやすい場所に保管した場合など)
- 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希釈が不正確

##### トラブルシューティングの方法

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し、古いワーキングストックに問題が認められた場合は破棄し、新しくワーキングストックを更新して下さい。Type A 検出系は各亜型の検出系に問題がないかどうか確認を行うための基準検出系として使用しますので、他の検出系で問題が見られる場合も、まず最初に Type A 検出系のトラブルシューティングを行って下さい。Type A 検出系に問題がないことを確認してから、Type A 検出系を基準にした各亜型の検出系のトラブルシューティングを実施して下さい。

- まずは新しいプライマーを用意するか適切に保管していたプライマーのマスターストックを用いて、新旧のプライマーで検出系を並べて比較検討し、古いプライマーに問題が見られた場合は、新しいプライマーに更新してください。
- プライマーを変更しても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、新しいプローブもしくは適切に保管していたプローブのマスターストックを用意し、新旧のプローブを使用して検出系を並べて比較検討し、古いプローブに問題が見られた場合は、新しいプローブに更新してください。
- 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あるいは適切に保管していたマスターストックを用いて新旧で比較検討し、古いプライマー、プローブに問題が見られた場合は破棄して、新しいものに更新してください。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、新規に購入したものあるい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するようにして下さい。また、新規に購入したプライマー、プローブを保管する際は、劣化が進まないように対策を講じて下さい(例：-70 度以下で保



### (添付資料 3)

管する、凍結融解の繰り返しを避けるため試薬類を小分け分注して使い切りにする、自動霜取り機能のついていない冷凍庫に保管する、扉の開閉による温度変化の影響が少ない場所に保管する、など)。

#### 原因 2 : ウイルスが変異した

ウイルスの変異により、プライマー・プローブ領域に変異が入ると、Type A 検出系と各 HA 検出系の Ct(Cp)値が大きく乖離する場合があります。ウイルスの変異が疑われる場合は、検出系の更新も検討しなければならない可能性があるため、感染研にご連絡下さい。

E. 特定の検出系で、 $10^1 \sim 10^3$  希釈陽性コントロールのシグナルが等間隔に立ち上がっていない。

原因 : 試薬類の調整方法、陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある。

A 項を参照し陽性コントロールの希釈方法や試薬調製方法に問題がないかどうか、C 項を参照し陽性コントロール自体に問題がないかどうか、D 項を参照し検出系のプライマー、プローブに問題がないかどうかを確認するなど、トラブルシューティングを実施して下さい。

F. Type A 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られる

原因 1 : 陽性コントロールのクロスコンタミネーションが起きている

反応試薬もしくは検体に陽性コントロールがクロスコンタミネーションした可能性が考えられます。検体からの RNA 抽出を行う安全キャビネット内のエリアや抽出した RNA を反応試薬に加えるエリアで、陽性コントロールの階段希釈や反応試薬への添加を行うなど、検体や反応試薬を扱うエリアと同じエリアで陽性コントロールを扱う操作を行っている場合、陽性コントロールのクロスコンタミネーションの危険性は増大します。

#### トラブルシューティングの方法

- 各エリアを次亜塩素酸で拭きあげて下さい。またその時に汚染が拡大しないよう留意し、エリア毎に使い捨て紙タオルを用いるなど個別に清掃して下さい。
- 汚染した可能性のある微量ピペッターを別のものに交換もしくは清掃（製品に添付の取扱説明書をご参照のうえ、可能な範囲内で内部の部品を含め次亜塩素酸で清掃後、蒸留水で十分すすぎ、清浄な環境下で乾燥させる）して下さい。なお、オートクレーブでは核酸は分解されません。核酸が蒸気とともに拡散して、周囲を汚染する可能性があるため、特にリアルタイム RT-PCR 反応後の PCR 反応産物はオートクレーブをかけないで下さい。
- 上記の対策を講じていてもコンタミネーションが続く場合、保管している試薬等がコンタミネーションしている可能性もあるので、RNA 抽出試薬を新しいものにする、反応試薬を新しいものにする、プライマー、プローブをマスターストックから作り直す、の順で試薬類を新しいものにかえ、古い試薬類は廃棄して下さい。
- 臨床検体の取扱い以外については、各作業を安全キャビネット内で行う必要は必ずしもありません。検査で使用できる安全キャビネット数が限られる場合、陽性コントロールの調製は



### (添付資料 3)

必ず最後に行い、一般の作業実験台の上で陽性コントロールの添加を行うなどの工夫をし、また、エリアを分けられない場合は、次回以降の検査へ影響しないよう、1 回ごとの検査後にクリーンアップするなどして下さい。

一人で検査を行う場合は、クリーンに扱うべき反応試薬の調整を最初に行うことをお勧めします。まず最初に、反応試薬を調製しプレートや反応チューブに分注し 4 度で一時保管します。次に検体の RNA 抽出処理を行い、検体を反応試薬に添加して再度 4 度で一時保管します。最後に陽性コントロールを調製し、陽性コントロール用反応試薬以外に入れないように添加すれば、試薬調製や RNA 抽出時に陽性コントロールの混入によるコンタミネーションの危険性は低減します。一度コンタミネーションが起きてしまうと、エリアの清浄化や微量ピペッターの交換や清掃、試薬類の総入れかえなど、多大な労力と経済的な負担がかかるため、日頃からコンタミネーションが起らないよう十分注意して検査を行って下さい。

### 原因 2：検体によるクロスコンタミネーションが起きている

原因 1 の陽性コントロールのコンタミネーション以外にも、RNA 抽出時あるいは抽出した RNA を反応試薬に添加する際に、検体間でクロスコンタミネーションが起きてしまう可能性も考えられます。

例えば、陽性だった全ての検体から H3 が検出され、1 つの検体は H1pdm09 も検出された場合、ウイルス量が  $H3 > H1pdm09$  だった時は、他の検体からのクロスコンタミネーションの可能性は低く、重複感染か陽性コントロールのコンタミネーションの可能性が考えられます。ウイルス量が  $H3 < H1pdm09$  だった場合は、H3 が他検体からのコンタミネーションの可能性も考えられます。その場合は、対象検体のみを再度 RNA 抽出から行い、再検査(他の検体と同時に検査しない)を行って、同じ結果が得られるかどうか確認する事をお勧めします。

### 原因 3：重複感染例の患者からの検体である

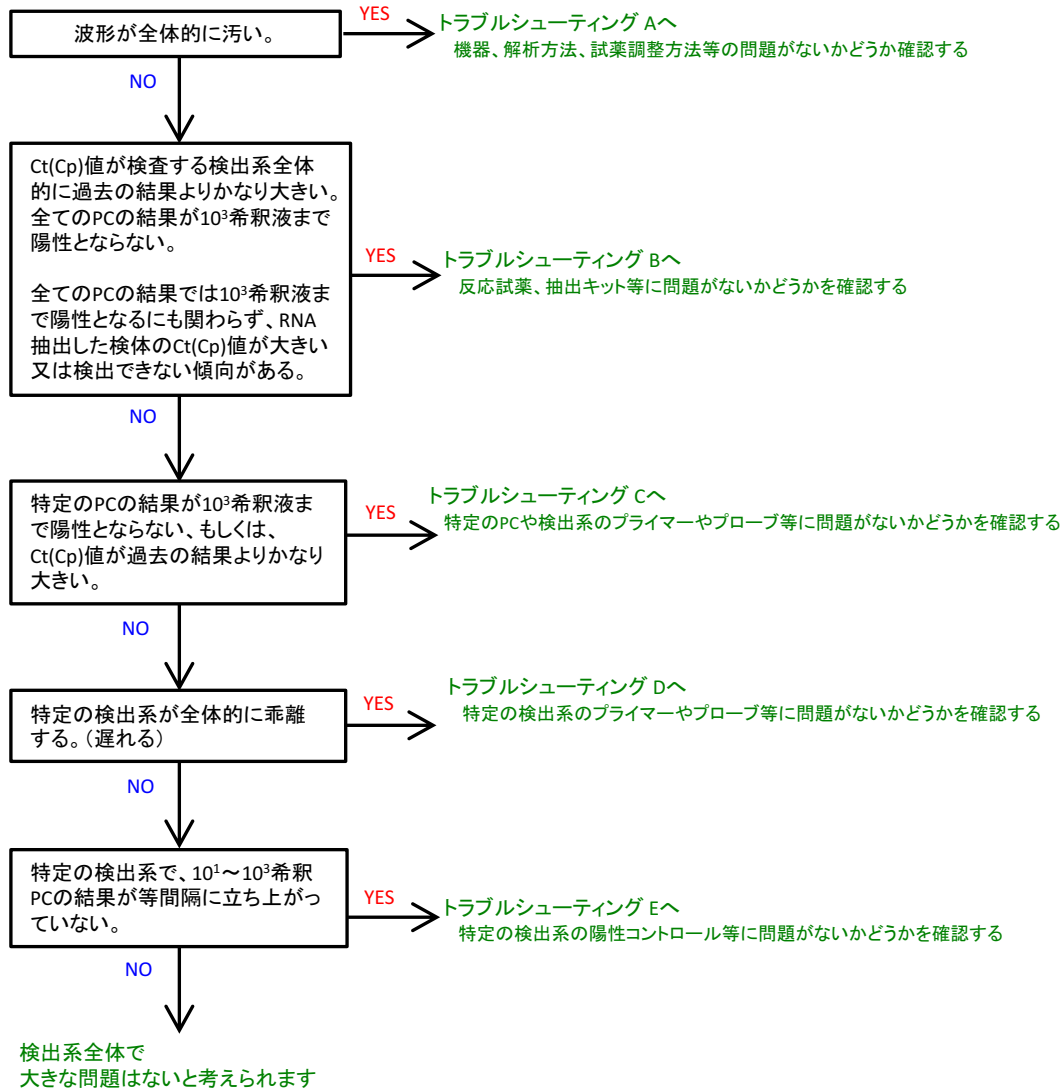
複数の型・亜型のインフルエンザウイルスが同時に感染している重複感染例の患者からの検体である場合、Type A 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られることがあります。先述したコンタミネーションによる誤った結果ではないことを見極めた上で、重複感染の可能性についても考慮するようにして下さい。

# トラブルシューティング時のフローチャート

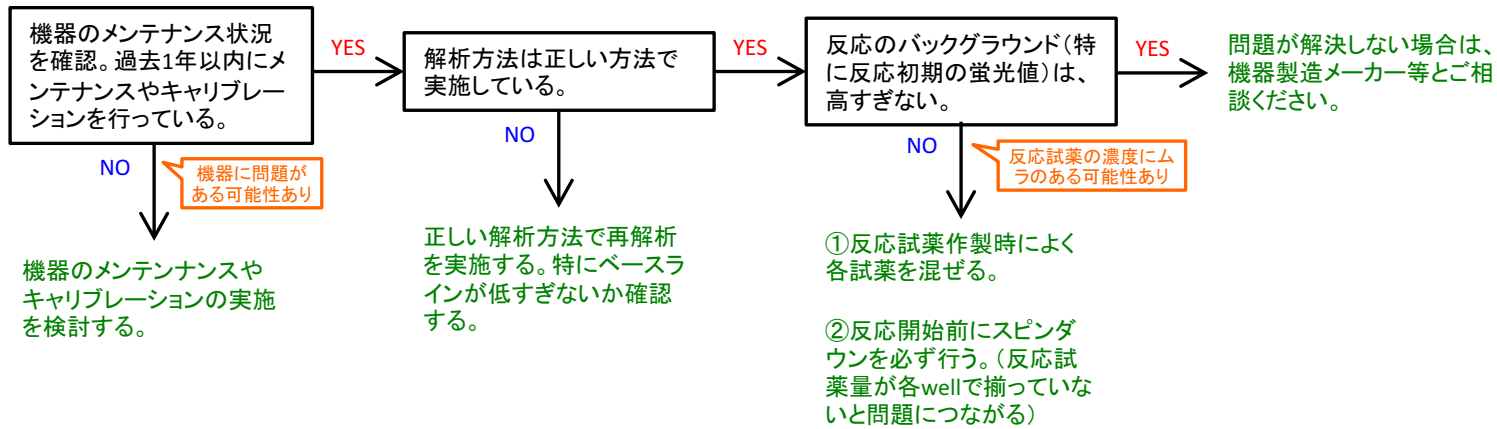
\* 問題点は、何度も同じように発生していますか？まずは、過去の検査結果等を見直し、問題点が再見されていることをご確認ください。再見されている場合は、本フローチャートにしたがって、適切なトラブルシューティングを行ってください。

\* 問題が再見されない場合(再現性が低い場合や検査毎・作業毎に異なる結果が出る場合)は、試薬調製方法やコンタミネーションが発生している可能性も考えられます。添付資料2の「精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」を参照のうえ、適切なトラブルシューティングを行ってください。

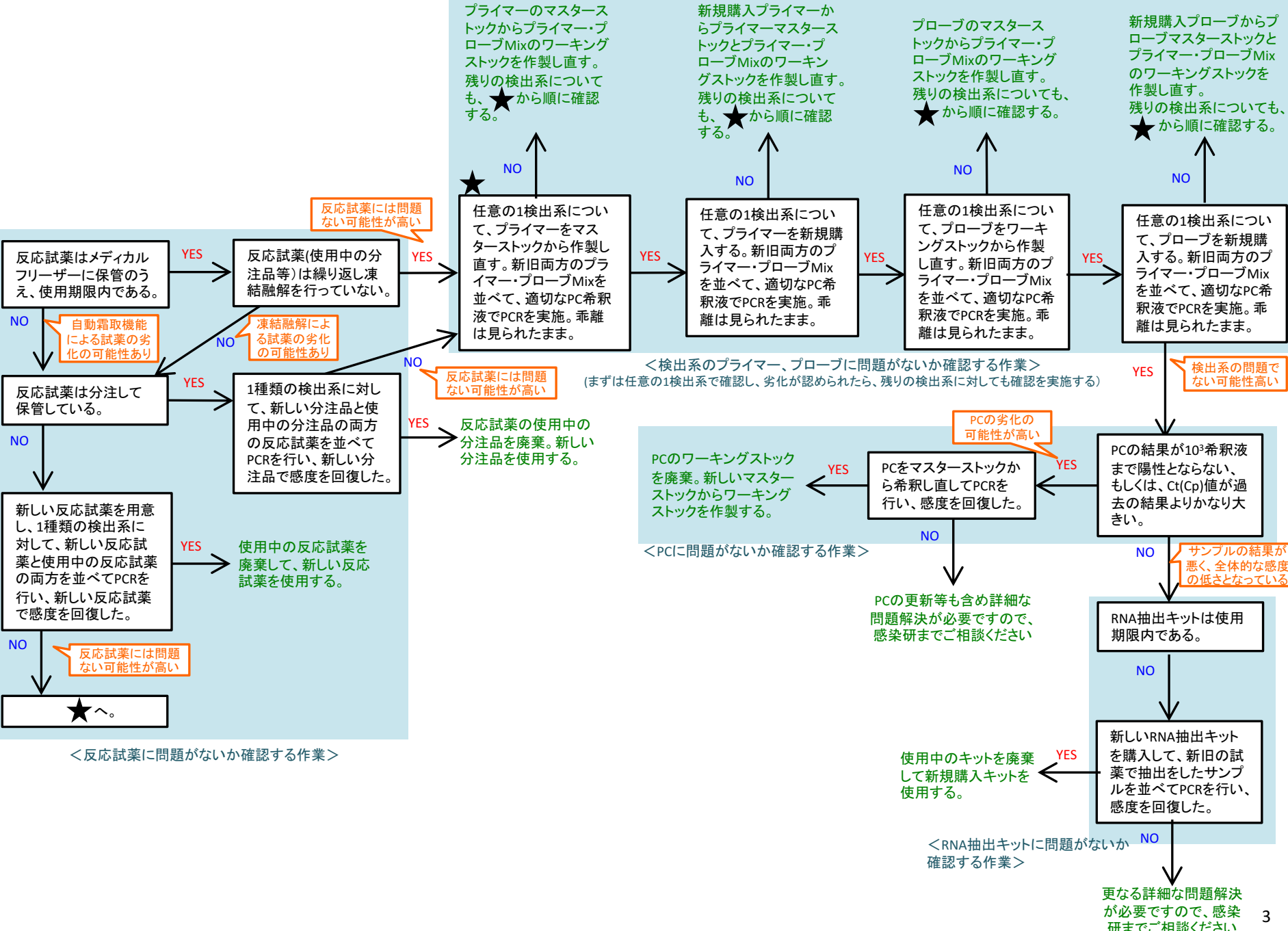
\*本フローチャートでは、陽性コントロールを「PC」と記載します。



## トラブルシューティング A



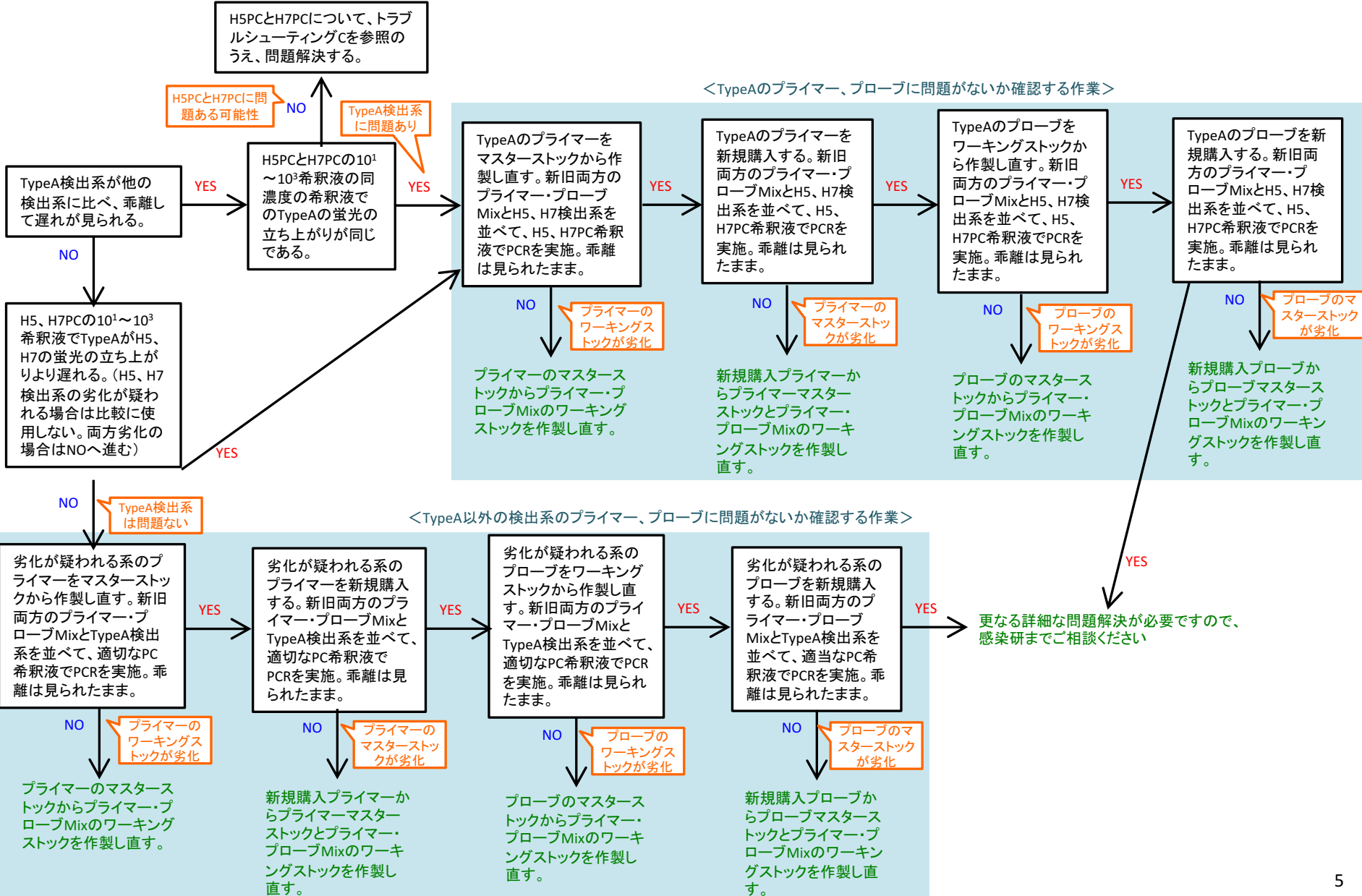
# トラブルシューティング B





# トラブルシューティング D

\* TypeAを基準検出系として各亜型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA検出系に問題がある場合は、最初にTypeA検出系のトラブルシューティングを行ってください。  
TypeA以外の系に問題が見られる場合は、問題のないTypeA検出系を基準にトラブルシューティングを実施してください。



# トラブルシューティング E

\*トラブルシューティング前に、PCの希釈の手順がきちんと行われていることを確認する。各希釈液は、15秒ボルテックス+10回転倒混和を行い、よく攪拌する。また、希釈液作製時は10倍濃い溶液を50μL以上持ち込んで希釈(50μL+450μLなど)を行うと、より誤差の少ない分取・分注を行うことができる。

