

新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等における精度管理マニュアル

厚生労働省事業「新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等にかかる精度管理調査業務」（2020 年 10 月 6 日—2021 年 3 月 31 日）において実施された精度管理実態調査と外部精度管理調査の結果の分析により、新型コロナウイルス PCR 検査等による誤判定の要因は、測定プロセスに加えて、測定前・測定後プロセスに起因することが考えられ、また、測定プロセスにおける再現性不良の実態と背景が明らかとなった。本マニュアルでは、この調査結果を踏まえて、新型コロナウイルス PCR 検査等の品質・精度の確保において留意すべきことを以下に記述する。

1. 検査室での留意点

1) 遺伝子関連検査における品質・精度の確保

医療機関や衛生検査所における検体検査の精度の確保は、医療法や臨床検査技師等に関する法律（以下、「医療法等」という。）により定める基準に則りそれぞれ実施する必要がある。この中で、遺伝子関連検査を実施する場合には、以下の対応が義務又は努力義務として求められている。

- ・ 精度の確保に係る責任者の配置
- ・ 標準作業書・日誌の作成
- ・ 内部精度管理の実施
- ・ 外部精度管理調査の受検
- ・ 研修の実施

測定前、測定、測定後の 3 つのプロセスそれぞれにおいて検査室の内部精度管理の一貫として日常的に実施すべき取り組みがあり、これらに関する留意点は以下のとおり。

【偽陽性を防止するための留意点】

- ・ 測定前プロセス：検体の取り違いやクロス汚染を回避する。検体の取り違い防止には、検体取り扱い手順に関する標準作業書への記載と遵守が必要であり、可能であれば検体容器をはじめ、測定プロセスにおけるバーコード管理を行う。クロス汚染の防止には、検体搬送の容器の共有を回避し操作ごと

に別々の装置・器具または使い捨てのものを使用することや、核酸抽出をするエリアと増幅・検出用の試薬調製をするエリアを分けて運用すること、異なるエリアでの装置・器具の共用は回避することが考えられる。RNA 抽出から増幅・検出の全プロセスを自動化した密閉鎖チューブ方式やカートリッジ方式の測定システムを利用することも有用である。

- ・測定プロセス：陰性コントロールとの同時測定を実施する。N-glycosyltransferase の利用により、増幅産物（アンプリコン）のキャリアオーバー汚染の影響最小化も可能であり、測定試薬の選択において考慮する。
- ・測定後プロセス：増幅産物のキャリアオーバー汚染による偽陽性結果の防止には、増副産物の周囲への飛散を防止することが重要であり、特に核酸増幅反応後のチューブの蓋を開けることは可能な限り回避する。また、測定前プロセスと増幅・検出を別の部屋で行い、検体のフローを一方行にする。

このほか、核酸増幅曲線での目視判定にて検出の有無を確認することも必要になる。偽陽性が疑われる場合は、結果を報告する前に、必要に応じて検査室内で実施可能な別の方法（検出標的遺伝子の異なる検出系あるいは抗原検査）で再測定した上で、報告することが望ましい。転記ミスの防止には、二重チェックを含めた手順の標準作業書への記載と遵守が必要である。

【偽陰性を防止するための留意点】

- ・測定前プロセス：患者病期に適した検体種の選択（初期は鼻咽頭ぬぐい液や唾液、肺炎症状時は喀痰など）や検体採取タイミングの適正化（唾液検体における食事・歯磨きの影響回避など）に留意する。
- ・測定プロセス：増幅検出プロセス（あるいは核酸抽出プロセスを含めた全プロセスを反応ごとにモニターすること、内部コントロール（サンプルやブランクに増幅標的を加えたもの）との同時増幅や核酸増幅曲線の波形の確認などがある）。

これら誤判定を未然に防止する検査室の取り組みに関する手順は、次項にて述べるプロセス管理のための「測定標準作業書」に記載すること。

2) 測定標準作業書等の作成と遵守

医療法等により検体検査の精度の確保に必要な標準作業書として、プロセス管理のための測定標準作業書、検査機器保守管理の標準作業書の作成等が求められている。このほか医療法等においてそれぞれ定められている作業日

誌・台帳の作成も必要となる。

「測定標準作業書」においては、検査項目ごとに、「定義」、「臨床的意義」、「測定方法及び測定原理」、「検査手順（フロー等）」及び「基準範囲及び判定基準」を盛り込む。並びに、以下の事項について、可能な限り検査法の標準化に必要な多くのものを盛り込むことが望ましい。測定標準作業書では、検査項目ごとに、「定義」、「臨床的意義」、「測定方法及び測定原理」、「検査手順（フロー等）」及び「基準範囲及び判定基準」を記載するとともに、以下の事項等、検査法の標準化に必要な事項を可能な限り多く盛り込むことが望ましい。

- ・ 性能特性（測定感度、測定内変動等）
- ・ 検査室の環境条件
- ・ 検査材料（検体量、採取条件等）
- ・ 試薬、機器、器具及び消耗品
- ・ 管理試料及び標準物質の取扱方法
- ・ 検査の変動要因
- ・ 測定上の注意事項
- ・ 異常値を示した検体の取扱方法
- ・ 精度管理の方法及び評価基準
- ・ 参考文献 等

これらを、検査機器等の取扱説明書等で代替する場合もあるが、検査機器等の取扱説明書には、測定前・測定後プロセスにおける運用法について言及されていないことが多いため、測定前・測定後プロセスでの過誤を防止するため、「測定標準作業書」の「検査手順（フロー等）」には、各検査室で構築した測定前・測定後プロセスを含めた作業手順の記載とそれに基づく運用が望ましい。

「測定標準作業書」には、検査導入時の性能特性の評価（妥当性確認・検証）に基づく検出限界を含めた性能特性の確認内容や、内部精度管理に関する作業手順も含めて記載すること。

性能特性のうち、特に、検出限界や精度（再現性）は、核酸抽出・増幅検出の総合した全プロセスにおける評価、判定基準の設定が必要である。

3) 検査導入時の性能特性の評価（妥当性確認・検証）と再評価

使用する試薬が薬事未承認の場合は、検査導入時に、各検査室の責任で、検査目的に合致した性能特性を評価し、必要な性能特性を確保しなくてはならない（妥当性確認）。使用する試薬が薬事承認済の場合においても、特に検

査室での導入時に性能特性の評価が必要である（検証）。

検出限界や精度（再現性）を確認しない場合、特に低濃度の検体の測定における結果の再現性に影響し、偽陰性や偽陽性結果の誤判定の背景要因となりうる。性能特性に関する用語と定義は、巻末の「性能特性の評価に関する用語説明」を参照されたい。

リアルタイム RT-PCR における陽性判定の基準として Threshold Cycle (Ct) 値を用いる場合、精度管理実態調査の結果では、多くの施設でメーカー指定値の 40 を用いていたが、Ct 値は測定試薬の性能のみならず、試薬と測定装置との組み合わせ等により変動することから、検査導入時に検出限界を含めた性能特性の評価を行い、陽性判定の基準となる Ct 値を定めることが重要である。

検出限界、分析特異性、精度の評価においては、アッセイに用いる臨床検体の種類（上気道スワブ、唾液、喀痰など）と同様な性状（粘度など物理的性状、蛋白質など化学的性状）を有する検体との組み合わせにより測定する必要がある。検出限界の評価は、核酸抽出と増幅・検出を組み合わせた性能特性として評価する。

新型コロナウイルスは DNA ウイルスと比較して変異しやすく、プライマー・プローブ結合部位の変異による検出限界の低下の可能性が指摘されている。検査導入時の性能特性の評価で確認した検出限界は、ウイルス進化に応じて再確認する必要がある。再確認のタイミングは、検出限界の低下（あるいは偽陰性）の可能性が示唆される場合で、例えば、外部精度管理調査への参加における低濃度試料の測定での偽陰性の誤判定、測定試薬の製造業者から変異株について分析感度低下の可能性について情報提供があった場合などがある。外部精度管理調査へは定期的な参加が推奨される。

4) 内部精度管理

PCR 検査を含めた遺伝子関連検査を実施する場合、医療法等により、内部精度管理の実施は義務として求められている。実施内容として、コントロール測定の頻度はラン毎に行う。内部精度管理は、測定システムの安定性による精度（再現性）を確保する上で必要であり、その際に統計学的に妥当な許容範囲（管理限界）の指標と基準について、あらかじめ定めておく。許容範囲（管理限界）とは、精度管理データのばらつきが許容できる範囲（限界）をいう。精度管理データには、管理試料として陽性コントロールを測定し、その Ct 値や Threshold time (Tt) 値を用いることが考えられる。

具体的には、陽性コントロールの測定値の日内・日間の変動を管理するため、代表的な $\bar{x}-R$ 管理図では、検査導入時に評価した測定値の精度（再現性）に基づくばらつきの管理限界（例えば、 $\pm 3SD$ ）を設定し、検査導入後に日常検査の実施中に測定した管理試料の結果について、その平均（ \bar{x} ）と個々の測定値の最大と最小の差（ R ）を経時的（例えば、毎日）にプロットしてグラフ化し、モニターする。 \bar{x} と R が管理限界内にある場合は、測定結果が安定的に得られていると見なす。

管理限界を外れた場合、あるいは管理限界内でも偏位の傾向（トレンド、シフトなど）が見られる場合は、測定結果の安定性が確保されていない可能性が考えられ、原因の究明とそれに基づく是正を行う。原因として、測定装置（保守管理）や測定試薬（試薬劣化など）の不具合がないか、試薬管理（遮光、保管温度など）、装置操作手順、測定者の手技・技能（ピペット操作など）、検体管理が不適切でないかの確認を行う。定期的に、また測定試薬のロット変更時など必要時に、患者検体またはフルプロセスコントロールを用いて、各プロセス（検体の前処理、RNA 抽出、逆転写、核酸増幅と検出）で患者検体と同じ挙動（反応過程）をモニターすることが望ましい。

外部精度管理調査において定性測定の再現性不良（例えば2回測定の場合、陽性と陰性判定1回づつ）が認められる場合は、改めて再現性を含めた性能特性の評価を行い、測定者の手技、測定試薬、測定装置などの原因（上述）に基づく是正が必要である。検査導入時に性能特性の評価において精度（再現性）の確認を行うとともに、その後も精度が維持されているか、統計学的な内部精度管理により確認することが望ましい。

5) 要員の研修

医療法等により、遺伝子関連検査を実施する場合、研修の実施は義務として求められている。特に、測定システムの性能評価（妥当性確認、検証）など検査導入と管理における基本的知識と技能の習得は重要である。

基本的知識には下記が含まれる。

- a) 品質マネジメントシステム
- b) 文書管理
- b) 測定システムの性能特性の評価（妥当性確認と検証、検出限界、精度（再現性）、診断感度・診断特異性、偽陽性・偽陰性など）
- c) 内部精度管理・外部精度管理
- d) 業務プロセスおよび手順
- e) 検査室情報システム
- f) バイオリスク・マネジメント

- g) 有害インシデントの影響の回避を含む安全衛生
- h) 検体の利用に関する倫理、患者情報の守秘義務
- i) 関連法規

基本的技能には下記が含まれる。

- a) 个人防护具の脱着
- b) 装置の操作
- c) 用手操作：ピペット操作など。
- d) 汚染防止

2. 精度管理実態調査と外部精度管理調査の結果の分析に基づく対応

1. に示した留意点に基づき、使用する全ての測定システムについて、各検査室の責任において、使用目的・用途によって必要な検出限界や精度（再現性）など性能特性を評価・確保する。

表1に、外部精度管理調査の結果に基づく誤判定（偽陽性、偽陰性）の要因と対策のまとめを示すので運営に当たり参考とされたい。

表1. 誤判定の要因と対策

誤判定の要因	考えられる要因	対策
陽性の判定基準の設定不良	検出限界の再現性不良、 検出限界、分析特異性、 判定基準のメーカー指定値の使用（Ct40 など）	妥当性確認・検証の実施による検出限界の確保に基づく、判定基準の設定
検出限界不足	ウイルス進化 核酸抽出効率の低下	ウイルス進化に応じて再評価 患者検体のマトリックス存在下での性能の再評価
検体取り違い、増幅曲線の目視確認不足、結果の転記誤り	測定標準作業書の記載内容不足 測定標準作業書として、 取扱説明書利用	測定前・測定後プロセスの手順の記載（検体取扱い、クロス汚染の回避、増幅曲線の目視確認、結果の転記など）
精度（再現性）不足	内部精度管理において、 コントロール試料頻度不足 管理限界（許容範囲）の 指標項目と基準の設定なし	手技（ピペット操作）、測定試薬、 測定装置など原因と是正 コントロール試料の適切な使用（種類、頻度） 性能特性に基づく管理限界の基準設定に基づく内部精度管理
偽陽性	増幅産物のキャリアオーバー汚染	陰性コントロールとの同時測定、カートリッジ方式、 <i>N</i> -glycosyltransferaseによる増幅産物のキャリアオーバー汚染の影響回避、疑われる場合は別の方法（検出標的遺伝子の異なる検出系あるいは抗原定量検査）での再検査、

		測定前プロセスと増幅・検出を別の部屋で実施、検体フローの一方通行化
偽陰性	不適切な時期、不適切な検体採取（技術、量、品質）、不適切な時期・検体種、増幅阻害因子の存在、ウイルスの熱不活性化のプロトコール	患者病期に適した検体種の選択指導（初期は鼻咽頭粘液、唾液、肺炎症状時は喀痰など）、検体採取タイミング（唾液検体での食事・歯磨きや喫煙の影響回避など）、内部コントロールとの同時増幅や核酸増幅曲線の波形の確認

【資料：性能特性の評価に関する用語説明】

1) 性能特性の評価

検査室は、性能特性の評価のため妥当性確認および検証のデザインを確立し、測定手順が意図された用途に適しているか性能特性について妥当性確認、検証をしなければならない。測定手順の性能特性には、一般的に精確さ、真度、併行精度および中間精度を含む測定の精度（再現性）、測定不確かさ、干渉物質を含む分析特異性、頑健性、検出限界および定量限界、測定範囲、診断感度、診断特異性、臨床的パフォーマンスなどがある。以下に、核酸増幅法による SARS-CoV-2 検出において重要と思われる性能特性について WHO 提案事項、FDA ガイダンスを参考に留意すべき用語説明を記述した。

2) 妥当性確認

妥当性確認とは、客観的証拠を提示することによって、特定の意図された用途または適用に関する要求事項が満たされていることを確認することをいう。妥当性確認の目的は、検査室が独自に開発した試薬・装置による検査（LDT）が対応する臨床用途を満たすことができるかどうかを評価することである。薬事承認が未取得の試薬（研究用試薬）を使用する施設では、検査導入時に、検査室の責任により検査目的に合致した性能特性を評価し、必要な性能特性を確保しなくてはならない（妥当性確認）。また、薬事承認済の試薬を使用する施設でも、測定条件の変更や適応外の検体種を用いるなど指定の手順を変更する場合、妥当性確認を改めて行わなければならない。

3) 検証

検証とは、客観的証拠を提示することによって、要求事項が満たされていることを確認することをいう。検査室は、改変なしに使用されている妥当性確認された薬事承認済の試薬が日常検査で使用開始される前に、独自に測定手順の性能仕様要求に合致している客観的証拠（性能特性）を検証する必要がある。検査室の環境と施設の運用に従って、検査室に適した性能特性を検証しなければならない。検証された薬事承認済の試薬が別の検査室に運用される場合、関連する性能特性が環境の変化によって影響を受けていないことを確認しなければならない。

薬事承認済又は製造販売届出済の試薬と医療機器は、試薬添付文書や装置仕様書に記載されている評価指標に従って検証し、それぞれの環境での適合性を証明しなければならない。

4) 精確さ (Accuracy)

精確さとは、測定結果の真度（正確さ）と精度（再現性）を含めた測定量の真の値との一致の度合いをいう。核酸増幅法における定義は、測定に由来する核酸配列と参照配列との一致の程度である。

精確さの評価は、定量範囲内で評価し、理想的には標準物質、認証標準物質を使用して行う必要がある。また、複数の検体種（例：鼻咽頭スワブ、鼻スワブ、唾液、気管支肺胞洗浄液、喀痰、全血、便など）を用いて検出が可能の場合、すべての検体種で精確さを評価する必要がある。臨床検体が得られない場合、その代用には、健常者検体または人工試料を希釈用マトリックスとして選択し、既知の濃度の不活化ウイルスをスパイクして作製する。評価用のサンプルサイズは20以上で、一致率95%以上で評価する。外部精度管理調査への参加も精確さを評価する方法である。

5) 精度 (precision)

精度（再現性）とは、定められた条件のもとで繰り返された独立な測定結果の間の一定の程度をいう。精度評価には、同一施設内において、人、装置、試薬、日時が同一とみなされる条件による検査結果の精度である併行精度。同一施設内において、人、装置、試薬、日時の一部またはすべてが異なる条件による検査結果の精度である室内再現精度（中間精度）。異なる施設で、人、装置、試薬、日時のすべてが異なる条件による検査結果の精度である室間再現精度がある。精度の評価は、核酸抽出から始まる。精度評価に使用されるサンプル（試料）には、管理試料または患者検体がある。サンプル（試料）の選択には、最低1つの陰性検体、1つの低陽性検体（例：約 $2\sim 3\times LoD$ ）、および1つの中程度の陽性検体（例：約 $5\sim 7\times LoD$ ）の少なくとも3つのレベルが含まれる。製品の特性に応じて、適切な精度要件を設定しなければならない。精度は、標準偏差（SD）など統計量で表現しなければならない。

6) 検出限界 (LoD: Limit of detection)

検出限界（LoD）とは、分析対象物質が定量的でないが存在するということが高い信頼度でいえる最小量（値）をいう。検査室は、試料の準備から検出まで、日常のワークフローを利用して検出法のLoD（コピー/ mL）を決定しなければならない。SARS-CoV-2が組み込まれた参照物質がない場合は、適切なマトリックスで希釈した細胞培養ウイルスが使用できる。必要なバイオセーフティーレベルの状況によって細胞培養ウイルスを使用できない場合は、*in vitro*で転写またはウイルス粒子に組み込まれたSARS-CoV-2 RNAを使用して検出法のLoDを確認することができる。暫定的なLoDは、準備した試料の2~3倍の希釈系列を各

濃度 3~5 回の反復測定で確認する。暫定的な LoD が確認できたら、より正確な LoD 推定値は、暫定的な LoD 値の前後の少なくとも 20 種希釈系列を検討して、最小 95% (19 種/20 種) の系列で陽性が検出されることを確認しなければならない。LoD は、検体種ごとに決定する必要がある。なお、LoD は報告結果とともに臨床側へ報告しなければならない。

7) 分析感度 (Analytical sensitivity)

分析感度とは、測定装置における反応変化 (分析物の変化) を対応する分析物で割ったものとして定義される。しばしば、「分析感度」または「感度」は、「LoD」、「下限 LoD」、または「検出限界」と互換性をもって使用される。新型コロナウイルス核酸検査に関する WHO 提案事項、FDA ガイダンス文書において分析感度と LoD が併記されている。

8) 分析特異性 (Analytical specificity)

分析特異性では、干渉物質と交差反応を確認しなければならない。SARS-CoV-2 核酸検出の場合、干渉物質には、サンプリング時に生じた干渉や、検体中の成分自体 (さまざまな潜在的な薬物の干渉を含む) などが含まれる。交差反応は、主に一般的な呼吸器感染症の病原体がこの検査に交差干渉を及ぼすかどうかを考慮しなければならない。1 回のテストで発生するランダムエラーを回避するために、3 回測定することが望ましい。

9) 頑健性 (Robustness)

検査プロセスにおいては、検体や試薬の性状が不適切な場合、あるいは指定された使用条件が満たされていない場合などが、測定パフォーマンスの頑健性に影響を与える可能性がある。

検査室は、影響を与える可能性のある要因を考慮し、それぞれの影響レベルを評価する必要がある。核酸増幅法における検査結果に影響を与える要因の影響レベルを十分に評価する。

9) 臨床的パフォーマンス (Clinical performance)

臨床的パフォーマンスとは、意図された用途 (臨床検査の目的、対象集団および個別患者) に従って、特定の臨床状態と相関する結果が得られる測定試薬、装置の能力をいう。遺伝子関連検査においては、測定の対象となっている疾患が診断できることにより今後の見通しについての情報が得られ、適切な予防法や治療法に結びつけることができるなど臨床上のメリットがある。使用目的に応じて、臨床的パフォーマンスには、既知の臨床状態または個人における生理学的/

病理学的プロセス・状態に基づく、期待値、診断感度および診断特異性ならび疾患の有病率に基づく陰性予測値および陽性予測値を含めることができる。

臨床的パフォーマンスの評価には、検出可能なすべての検体種を含め、検査の使用目的と完全に合致させて結果を説明するために対応する統計解析法を確立しなければならない。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課. 国立感染症研究所
臨床検体を用いた評価結果が取得された 2019-nCoV 遺伝子検査方法について.
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV-17-current.pdf>
2020年10月23日.
- 2) 国立感染症研究所ほか. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 第 3.1 版. 2021年3月3日.
- 3) 2019-nCoV (新型コロナウイルス) 感染を疑う患者の 検体採取・輸送マニュアル
~2020/07/17 更新版~
https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/2019-nCoV_200717.pdf
- 4) ISO 15189 Medical laboratories – Requirements for quality and competence, 日本規格協会, 2012.
- 5) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書. 学術広告社. 東京. 2019年11月.
- 6) 厚生労働省「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について」(平成30年8月10日)
<https://www.ajhc.or.jp/siryu/20180810-2.pdf>
- 7) 宮地勇人. 検体検査の品質・精度確保に係る医療法等の改正の経緯と意義. Medical Technology 臨時増刊 2018年12月; 46(13): 1248-1252.
- 8) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 定量測定法に関するバリデーション指針, 臨床化学, 40:149, 2011.
- 9) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 定量分析法における検出限界および定量限界の評価法, 臨床化学, 35:280, 2006.
- 10) Instructions for Submission Requirements IVDs Detecting SARS_CoV_2 Nucleic Acid. WHO. PQDx 347 version 2. 23 March 2020
- 11) Immediately in Effect Guidance for Clinical Laboratories, Commercial Manufacturers, and Food and Drug Administration Staff. FDA. July 28, 2020.
- 12) 臨床検査法提要 改訂第 35 版. 監修 金井 正光 金原出版. 東京. 2020.