

# 新型コロナウイルスの核酸増幅検査

## Nucleic Acid Amplification Testing for SARS-CoV-2

あお き こうたろう いし い よし かず  
青 木 弘太郎：石 井 良 和  
Kotaro AOKI Yoshikazu ISHII

### はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) の検査は、COVID-19 蔓延当初から核酸増幅法を原理とした検査により行われてきた。本稿執筆時点 (2020 年 11 月) において、COVID-19 の診断あるいは蔓延防止を目的として、地方衛生研究所、病院、民間の衛生検査所、あるいは臨時に開設した衛生検査所で実施されている。しかしながら、各検査機関の判断で様々な抽出キットと検査キットなどの組み合わせが採用されており、検査の品質および精度が確保されているとは言えない。本稿では、SARS-CoV-2 核酸増幅検査の概要と精度管理の現状について概説する。

### I. 核酸増幅検査キットおよび試薬

原稿執筆時点までに、18 種類の核酸増幅法検査キットが COVID-19 体外用診断医薬品 (IVD) として承認されている<sup>1)</sup>。それらの検査キットの内訳として、TaqMan<sup>®</sup> プローブを用いた reverse-transcription (RT)-PCR が 13 キットと主な原理として採用されており、その他の原理として Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法、Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC) 法、Transcription Mediated Amplification (TMA) 法、SmartAmp 法、Nicking Endonuclease Amplification Reaction (NEAR) 法がそれぞれ 1 キットずつ採用されている。なお、IVD 承認を受けていない研究用試薬 (RUO) を用いた検査であっても、「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」(2020 年 10 月 23 日版)<sup>2)</sup> のとおり、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」<sup>3)</sup> に準じた方法に該当すると判断されれば、RUO 試薬を用いた検査であっても公的医療保険適用の対象とされている。東邦大学医学部微生物・感染症学講座 (当教室) においては同マニュアルに基づいた方法に加えて、BD MAX<sup>™</sup> (ベクトン・ディッキンソン) を用いた方法を構築し、並行して運用している<sup>4)</sup>。

### II. 精度管理

#### 1. 医療法等による規制

検体検査の精度の確保に係る医療法等改正により、「病院、診療所又は助産所の管理者は、自ら実施する場合および委託する場合において、検体検査の品質・精度確保について責任をもつこととなる」とある<sup>5)</sup> (「遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書」より引用。以下、ガイダンス文書)。医療機関が自ら遺伝子関連検査・染色体検査を実施する場合、管理組織の基準において、「精度の確保に係る責任者の配置」、「標準手順書の作成」、「作業日誌・台帳の作成と保存」、「内部精度管理の実施」、および「適切な研修の実施」が義務とされ、「外部精度管理調査の受検と研修の実施」が努力義務とされた。臨時的衛生検査所として SARS-CoV-2 核酸検査を行う場合においても、上述の基準をクリアする必要がある。

## 2. 検査系の妥当性確認

前出のガイダンス文書では、妥当性確認(validation)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」と定義されている。検査系の妥当性確認は、試薬キットとして販売されているものは製造元が、検査室が独自に調製して用いるもの(laboratory developed tests: LDT)は検査室自身が責任を持って行わなければならない。妥当性確認の項目としては、「検出限界(limit of detection: LOD)」、「定量限界(limit of quantitation: LOQ)」、および「直線性範囲(linearity)」などがある。これらを含めた性能評価項目は表1にまとめた。

## 3. 検出限界値(LOD)

LODは「試料中に存在する測定対象物の検出可能な最低の量」と定義される(表)。核酸増幅検査でSARS-CoV-2の存在を示すシグナルが得られなかったとしても、検体中にSARS-CoV-2が全く存在しないことを示すものではない。したがって、当教室では検査結果の報告に“陰性”という表現を用いず、“LOD未満(LODには確認された具体的な数字を表記)”という表現を用いて報告している。核酸増幅検査は検査前プロセス、検査プロセス、検査後プロセスの3つに大別される(図1)。検査前プロセスは

検体処理から核酸抽出まで、検査プロセスは核酸増幅から検出まで、検査後プロセスは検査結果の解釈および報告までを指す。SeraCare社は、SARS-CoV-2核酸増幅検査の各種キットが標的としているRNA領域を組替えたアルファウイルスで、複製能力を欠失した非感染性の製品(AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit)を2020年4月に発売した。本試薬を用いた当教室の検討によれば、核酸抽出工程の違いが核酸増幅検査のLODに大きく影響することが確認された(未発表データ)。例えば、検査工程を迅速化するために簡易核酸抽出試薬が採用された核酸増幅検査キットでは、通常の核酸抽出キットを使用した方法に比較して検出限界値は約10倍あるいはそれ以上高かった。核酸増幅検査キットは検査工程の簡便さとそれに対応するLODを認識して、状況に応じて使い分ける必要がある。

## 4. 内部精度管理

内部精度管理は、検査室内において精度管理物質を用いて当該検査系の妥当性を検証する作業である。日常的に行う内部精度管理は、フルプロセスコントロールのための精度管理試料(図1)の価格等の問題から、検査プロセスのみを評価するに留まることが多い。すなわち、検査標的塩基配列を含む陽性コントロールRNAを核酸増幅反応系にスパイクすることで実施する(図1)。当教室では、すべての

表1 検査の妥当性確認を目的とした性能評価項目

これらの性能評価項目は厚生労働省事業「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」で受検施設における状況を聴取された。

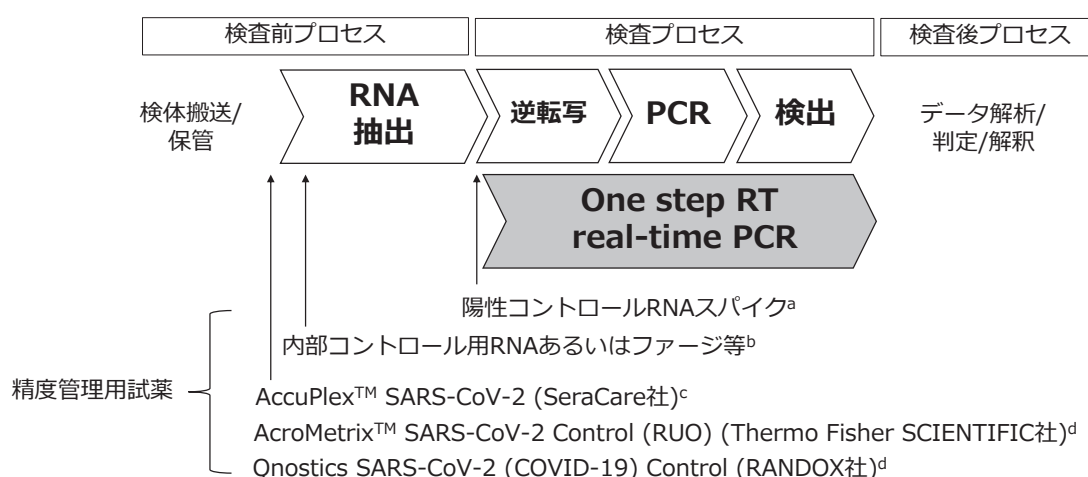
項目	英訳	内容
特異性(選択性) <sup>12)</sup>	specificity(selectivity)	諸成分の中に存在すると予測される測定対象成分を明確に区別する能力。
真度(正確さ) <sup>13, 14)</sup>	trueness	十分多数の測定結果から得られた平均値と採択された参照値との一致の程度であり、かたよりによって表現される。かたよりは、測定結果の平均値から参照値を引いた値となる。
精度 <sup>13, 15)</sup>	precision	定められた条件の下で繰り返された独立な測定結果の間の一致の程度。通常、精度はその悪さによって表現され、測定結果の標準偏差として計算される。
検出限界 <sup>12)</sup>	limit of detecton	試料中に存在する測定対象物の検出可能な最低の量。
定量限界 <sup>12)</sup>	limit of quantitation	適切な精度と正確さを伴って定量できる、試料中に存在する測定対象物の検出可能な最低の量。
検出感度 <sup>12)</sup>	sensitivity	対照手法により測定対象物が検出された症例数に対して、被験手法により測定対象物が検出された症例数の割合。
直線性範囲 <sup>12)</sup>	linearity	一定の範囲内で試料中の測定対象物の濃度(量)と直線関係にある測定値を与える能力。
頑健性 <sup>12)</sup>	robustness	測定法の条件を小さい範囲で故意に変動させたとき、測定値が影響を受けにくい能力のことであり、通常の状態における測定法の信頼性の指標。
トレーサビリティ <sup>16, 17)</sup>	traceability	不確かさがすべて記載された切れ目のない比較の連鎖を通じて、通常は国家標準または国際標準である決められた標準に関連付けられ得る測定結果または標準の値の性質。
不確かさ <sup>16), 17)</sup>	uncertainaty	測定の結果に付随した、合理的に測定量に結び付け得る値のばらつきを特徴づけるパラメータ。

検査バッチで LOD 付近 (100 ゲノムコピー / 反応) になるように陽性コントロール RNA をスパイクすることで内部精度管理を行っている。また、リアルタイム PCR を原理とした RT-PCR の場合は Threshold Cycle (Ct) 値が得られるため、精度管理物質の Ct 値を経日的に記録して日差再現性を確認している。陽性コントロール RNA を測定した Ct 値が、複数回の測定バッチの Ct 値の平均値の標準偏差の  $\pm 3$  倍を外れた場合は、偶然ではない誤差が発生したとみなし、根本原因を特定するとともに再発防止を行う必要がある。なお、検査前プロセスから検査プロセスまでの一連の検査プロセスをキット化している製品では、それらの全プロセスが適切に実施され、かつ検体中に含まれる阻害物質の影響を受けずに適切に PCR が完了したことを確認するために内部コントロールが添加されている。例えば、LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control (Roche) および BD MAX™ ExK TNA-3 (Swab) は核酸抽出プロセスに内部コントロールを含める形であり、multiplex real-time PCR の検出波長のうちの 1 つを利用して検出される。ただし、これらは RNA そのものを添加して評価しているに過ぎず、検査標的の検出の質を確保していることにならない点に注意する。

## 5. 外部精度管理

外部精度管理は、同一の精度管理試料を用いて施

設間差を確認すること、および問題点を是正することを目的に実施される。外部精度管理においてはフルプロセスコントロール、すなわち検査前プロセスから検査後プロセスまでの全プロセスを評価する必要がある。SARS-CoV-2 核酸検査フルプロセスコントロールが可能な精度管理試薬は、検査標的となる塩基配列 1 コピーが 1 つのウイルスパーティクルに包埋され、かつ溶液中のウイルスパーティクルの数が明らかでなくてはならない。これに該当する市販製品として、前出の AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit (SeraCare 社)、AcroMetrix™ SARS-CoV-2 Control (RUO) (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社)、および Qnostics SARS-CoV-2 (COVID-19) Control (RANDOX 社) がある (図 1)。東京都で実施された令和 2 年度東京都衛生検査所精度管理調査は AccuPlex™ を用いて実施された。当教室は新型コロナウイルス感染症に係る病原体核酸検査のみを行うために臨時に衛生検査所を開設しており、本精度管理調査を受検した。本精度管理調査は、東京都健康安全研究センターが配布した試料を、参加施設が定める手順に従って検査し、その結果をホームページから入力する形式で行われた。また、厚生労働省の事業として「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」の実施が計画されており、2020 年 11 月に精度管理試料が配布され、各参加施設において測定された。



本図では、核酸増幅検査として逆転写 (RT, reverse transcription) から検出までを one step で行う TaqMan® プローブ法を例として示している。

ᵃ 検査標的塩基配列を含む RNA をスパイクすることにより検査プロセスの性能を確認する。

ᵇ 検査標的とは異なる塩基配列の RNA あるいはそれをゲノムに持つファージなどを添加し、それが検査プロセスで検出されることを確認することで一連のプロセスが問題なく実施されたことを確認する。しかし、検査標的を検出するための検査の精度管理には当たらない。

ᶜ 核酸増幅標的部分あるいは SARS-CoV-2 ゲノム全長を複製欠損ウイルスに内包したフルプロセスコントロール試薬。

ᵈ 不活化した SARS-CoV-2 によるフルプロセスコントロール試薬。

図 1 SARS-CoV-2 核酸増幅検査の精度管理



## 6. 装置の性能確認

リアルタイム PCR サーマルサイクラー等の装置は、ウェルブロックの温度を制御することで反応チューブ内の試薬温度を上下させる、あるいは特定の温度で維持することで酵素反応により核酸増幅し、その増幅産物から発せられる蛍光の強度に基づいて検出する。ウェルの温度の上下に必要なランプタイムは、DNA 合成酵素等の活性に影響することで核酸増幅効率に影響する。また、多くの装置では多検体処理が可能となっているが、ウェルのポジションによってはランプタイムが異なることが知られている。また、増幅産物の蛍光シグナルを読み取るには励起により発光する蛍光検出が必要になり、光学系の不具合によりノイズが多く混入することがある。これらの結果に影響を与える要因を総合的に評価するため、装置を導入して検査に使用する前に全ウェルで同一バッチの陽性コントロールを測定し、機器が期待通りに稼働していること、ウェル間差が許容範囲内であることを確認する必要がある。

## 7. 検査材料と診断感度

現時点において、COVID-19 診断のための核酸増幅検査材料として鼻咽頭ぬぐい液および発症 9 日以内の唾液の使用が認められている。鼻咽頭ぬぐい液検体を用いた検査の診断感度は、発症から 3 日前後をピークに前後ではゆるやかに低下すると指摘されている<sup>6)</sup>。唾液検体は自己採取可能かつ非侵襲的であること、加えて一部の海外の研究グループからは鼻咽頭ぬぐい液に比較して、唾液は同等あるいはそれ以上の SARS-CoV-2 RNA コピー数が存在することが報告された<sup>7,8)</sup>。ただし、厚生労働省の調査では発症から 10 日目以降は唾液と鼻咽頭ぬぐい液の PCR 検査の一致率が悪化したことから<sup>9)</sup>、同 9 日目以前の検体に限るとされた。COVID-19 のエピソードにおいて、SARS-CoV-2 は発症前から検体中のウイルス量が増加し、発症前の濃厚接触時に伝播させることが指摘されていることから、無症候者の中から SARS-CoV-2 を伝播させるリスクの高い人を検出する感染制御の目的で行う核酸増幅検査には、唾液を用いることができるという見解が出された<sup>10)</sup>。PCR 検査の問題点として、検体中のウイルス量が下記に示す検出限界値に近い場合に、結果に揺らぎ(期間

をあけて採取された検体の結果が陽性、陰性、となったあとに陽性、など)が観察されることが報告されており<sup>11)</sup>、東邦大学医療センター大森病院の症例でも経験した(論文投稿中)。

## おわりに

COVID-19 診断のための SARS-CoV-2 核酸増幅検査は、急速に普及した反面、十分に精度が保証されていないまま運用されている。COVID-19 の蔓延は、臨床検査における核酸増幅検査の普及を促進するとともに、その精度管理に関する課題を浮き彫りにした。私達は COVID-19 の蔓延を通じて、核酸増幅の検査精度の重要性を学び、精度管理体制を含めて検査体制を改善・是正していく必要がある。

## 文 献

- 1) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症の体外診断用医薬品(検査キット)の承認情報.  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_11331.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html)(引用 2020/11/26)
- 2) 厚生労働省. 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(2020年10月23日版).  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjlvJbF-J7tAhVDL6YKHbpxA\\_4QFjAAegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.niid.go.jp%2Fniid%2Fimages%2F1ab-manual%2F2019-nCoV-17-current.pdf&usq=AOvVaw0mFRxna paeUsS-5yL0cU2i](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjlvJbF-J7tAhVDL6YKHbpxA_4QFjAAegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.niid.go.jp%2Fniid%2Fimages%2F1ab-manual%2F2019-nCoV-17-current.pdf&usq=AOvVaw0mFRxna paeUsS-5yL0cU2i)(引用 2020/11/26).
- 3) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1.  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>(引用 2020/11/26).
- 4) 日本臨床微生物学会. BD MAXを用いた 2019-nCoV 検出～One step RT real-time PCRによる検査手順書～.  
<http://www.jsbm.org/m-info/bdmax200428.pdf>(引用 2020/11/26).
- 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. 2019.
- 6) N. Sethuraman, S.S. Jeremiah, A. Ryo, Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2, *Jama*. 323(2020)2249-2251. doi:10.1001/jama.2020.8259.
- 7) Landry ML, Criscuolo J, Peaper DR. Challenges in use of saliva for detection of SARS CoV-2 RNA in symptomatic outpatients. *Journal of Clinical Virology* 2020; **130**: 104567-3. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104567.
- 8) Xu R, Cui B, Duan X, et al., Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci* 2020;

- 12: 1-6. doi:10.1038/s41368-020-0080-z.
- 9) 厚生労働省. 唾液を用いたPCR検査に係る厚生労働科学研究の結果について  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000635988.pdf>(引用2020/11/26)
- 10) 厚生労働省. 無症状者の唾液を用いたPCR検査等について.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000649879.pdf>(引用2020/11/26)
- 11) Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol* 2020; **92**: 903-908. doi:10.1002/jmv.25786.
- 12) 医薬品医療機器総合機構. 薬審第338号分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について.  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiMhPTCgp\\_tAhUZMd4KHRLGBI8QFjAAegQIBBAC&url=https%3A%2F%2Fwww.pmda.go.jp%2Ffiles%2F000156432.pdf&usg=AOvVaw1pKklqjSryKiG2WTcTskmI](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiMhPTCgp_tAhUZMd4KHRLGBI8QFjAAegQIBBAC&url=https%3A%2F%2Fwww.pmda.go.jp%2Ffiles%2F000156432.pdf&usg=AOvVaw1pKklqjSryKiG2WTcTskmI)(引用2020/11/26).
- 13) ISO 5725: 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
- 14) JIS Z 8402: 1999. 測定法および測定結果の精確さ.
- 15) 細萱 茂実: 臨床検査の標準化・精度管理・基準値. 臨床検査法提要 改定第33版, 金原出版, 1-30, 2010.
- 16) ISO 17511: 2003. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
- 17) ISO 18153: 2003. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to calibrators and control materials.