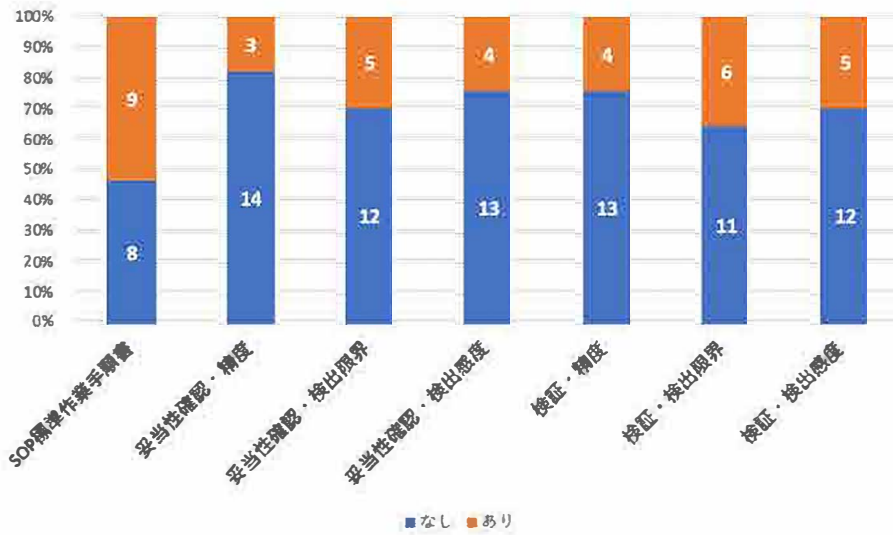
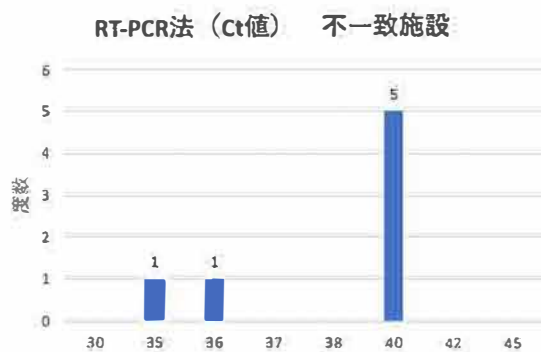


6) 導入時の性能評価項目 (妥当性確認・検証) (図 19) (n=17)

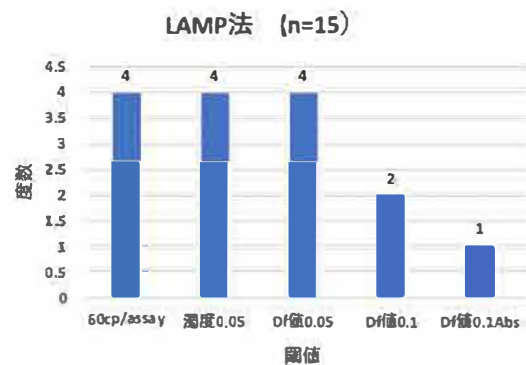
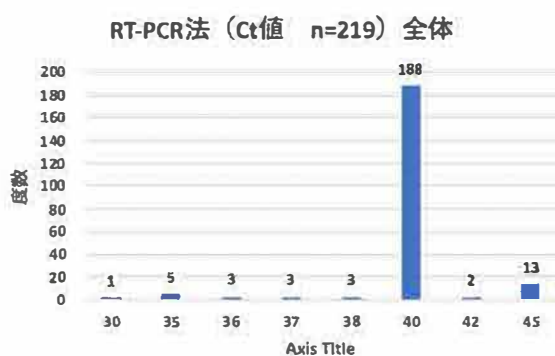


	SOP標準 作業手順書	妥当性確認 精度	妥当性確認 検出限界	妥当性確認 検出感度	検証 精度	検証 検出限界	検証 検出感度
なし	8	14	12	13	13	11	12
あり	9	3	5	4	4	6	5

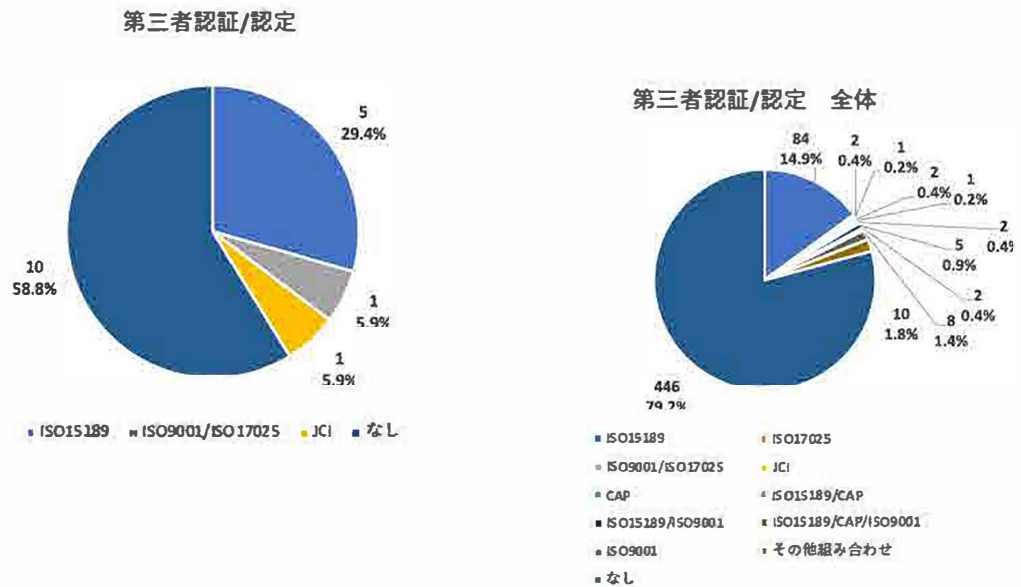
6) 陽性/陰性の判定指標(図 20)



対象データなし



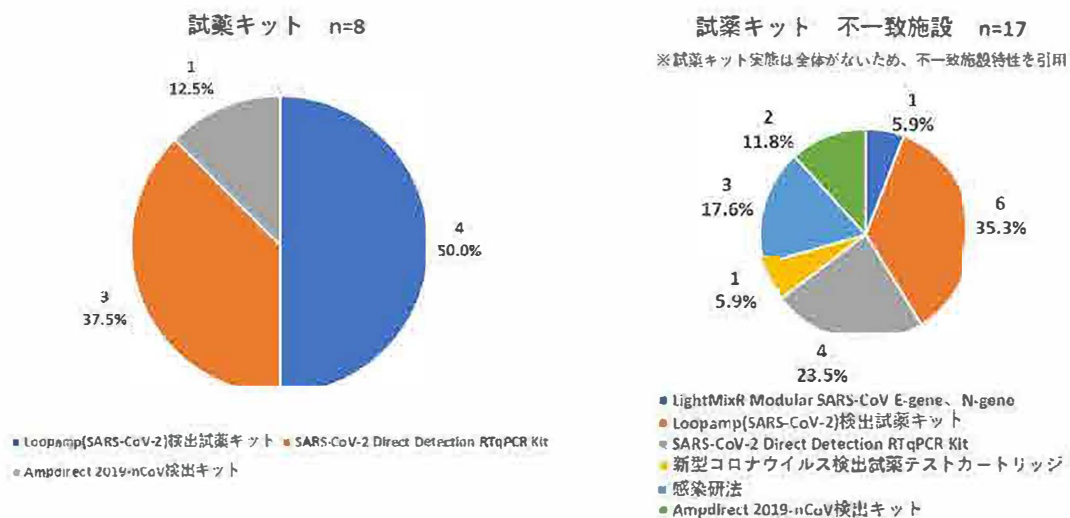
7) 第三者施設認定・認証(図 21) (n=17)



3. 定性再現性不良の施設背景

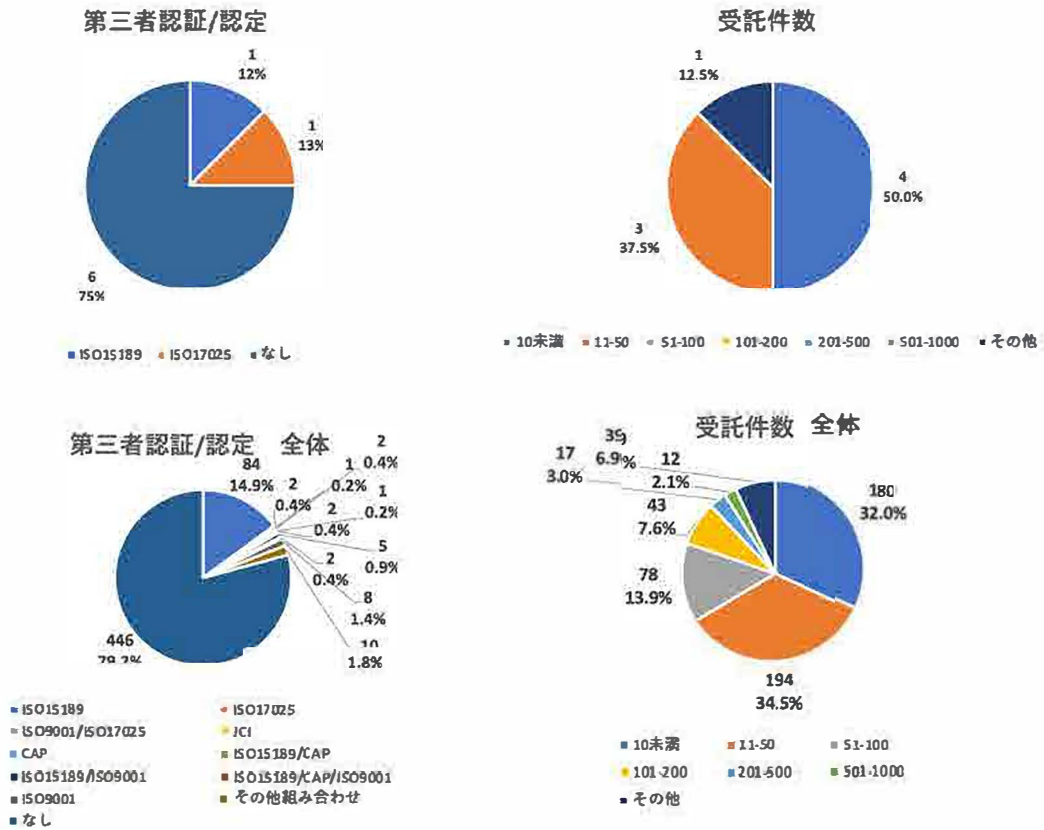
1) 試薬キット(図 22)

	試料①	試料②	試料③
一致	150	151	232
不一致	2	8	0

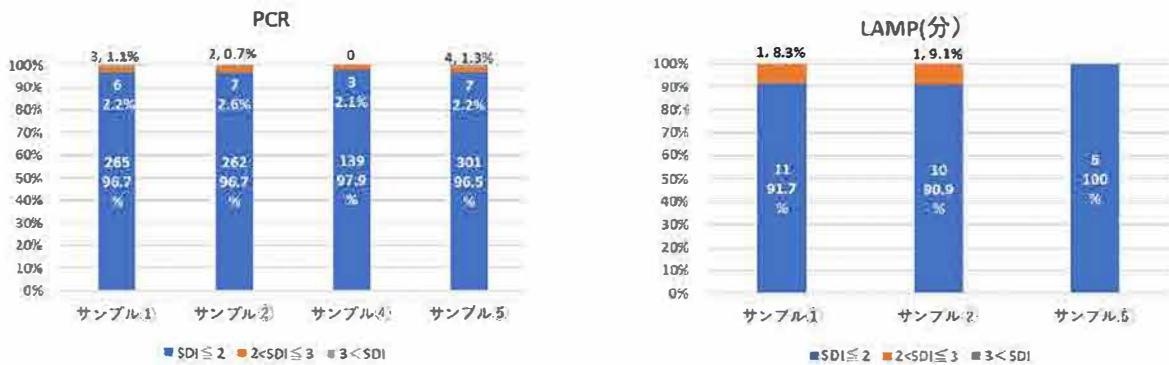


※再現性確認において試料①又は試料②で不一致となった施設

2) 第三者認定・認証と受託件数(図 23)



4. 定量的指標：SDI 分布（全体集計結果）(図 24)



PCR

	試料①	試料②	試料④	試料⑤
n	275	272	143	314
Mean	33.9	34.6	35.2	33.0
SD	1.6	2.5	2.3	2.8
SDI ≤ 2	266	262	140	303
2 < SDI ≤ 3	6	7	3	7
3 < SDI	3	3	0	4

LAMP(分)

	試料①	試料②	試料④	試料⑤
n	12	11	1	6
Mean	21.2	22.0		16.7
SD	4.4	3.5		0.6
SDI ≤ 2	11	10		6
2 < SDI ≤ 3	1	1		0
3 < SDI	0	0		0

5. 外部精度管理調査の結果のまとめと考察

1) 新型コロナウイルス核酸検査の測定項目において、多様な測定システムが利用されている状況『1. カラム等による抽出精製を実施している場合 (RT-PCR、LAMP 等)、2. 簡易抽出法 (ダイレクト PCR 等) にて RT-PCR を実施している場合、3. 全自動核酸増幅検査装置を利用し実施している場合』を踏まえて、測定試料として、増幅検出プロセスを評価する試料と核酸抽出・増幅検出の全プロセスを評価する試料の2種類 (それぞれ、異なる濃度の3試料①②③および④⑤⑥) 計6試料セットを準備し、各施設に送付した。その結果、全参加施設にて測定・報告された各測定試料の判定結果は、正答率 96.4-99.8%と全体として良好な成績であった。

試料別の誤判定率は、試料①0.2% (1/417)、試料②1.7%(7/418)、試料③0.2%(1/417)、試料④2.1%(4/192)、試料⑤3.6%(18/503)、試料⑥0.6%(3/498)であった。(カッコ内の数は施設数)

2) 装置、試薬別に見ると、装置と試薬の組み合わせで、10施設以上の場合を独立して取り扱う測定法群 (peer group ピアグループ) として解析した。その結果、18のピアグループが構成された。その内、装置と試薬ともに薬事承認等済6グループ、装置のみ製造販売届出済4グループ、試薬のみ薬事承認済3グループ、装置と試薬ともに薬事承認等済でない5グループであった。装置と試薬ともに薬事承認等済の場合、Loopamp EXIA/LF-160 と Loopamp(SARS-CoV-2)検出試薬キット (栄研化学) の組み合わせを除き、正答率 100%であった。装置と試薬ともに薬事承認未取得の場合でも正答率は高く、薬事承認等の有無は、正答率との関係で明らかな傾向は見られなかった。

3) 核酸抽出・増幅検出プロセス評価用の陽性試料⑤の誤判定の施設の多く

(16/18施設) は、装置ミュータスワコーg1・試薬ミュータスワコー COVID-19 を使用していた。その背景要因として、外部精度管理調査試料の取扱い説明の記載内容に不明確な点が明らかとなった。当初、配布試料の全量をスワブで吸着して日常検査と同様 (懸濁液に添加) に測定をするよう記載した。参加施設の多くでは、配布試料の全量でなく、スワブ1回で吸着した量 (約 40 μ L) を懸濁液に添加していた。また、製造販売業者からの要請で、懸濁液でなく、次の工程の前処理液への全量添加に変更し、試料の取扱い説明に反映させた。製造販売業者で後日に行った実験の結果、前処理液への直接添加では偽陰性結果となることが判明した。このため、本システムの判定結果の評価は、参考報告とした。結果として、評価対象とした試料別の不一致施設は、試料①1、試料②7、試料③1、試料

④4、試料⑤2、試料⑥3の延べ18施設となった。1施設が2試料の誤判定報告しており、合計17施設において、誤判定の要因を分析した。

4) 不一致施設(17施設)の特性として、行政検査の実施の有無、遺伝子関連・微生物検査関係の専門資格者の有無は、参加施設全体の傾向と大きな違いは見られなかった(それぞれ70.6 vs. 78.3%、23.5 vs. 18.8%)。施設カテゴリーでは、参加施設全体での割合と比較し、医療機関の比率は58.8%(10/17施設)と変わらず、衛生検査所(登録、衛生それぞれ3、2施設)29.4%(5/17施設)の割合が高く、行政機関(地方衛生研究所、保健所、検疫所)の比率は5.9%(1/17施設)と低い傾向が見られた。

5) 不一致施設の特性として、国際規格ISO 15189「臨床検査室－品質と能力に関する要求事項」など第三者施設認定・認証の取得施設が41.2%(7/17施設)で、参加施設全体の20.8%(117/563)と比べて高い比率であった。第三者施設認定・認証の取得施設のうち不一致施設の比率は6.0%(7/117施設)で、未取得施設のうち不一致施設の比率2.2%(10/446)と比べて高い傾向が見られた。

6) 不一致施設における薬事承認等済の装置・試薬使用の比率は、参加施設全体での割合と比較し、使用試薬について薬事承認済の施設の割合が増加した(参加施設全体54.0% vs. 不一致施設64.7%)。背景として、Loopamp(SARS-CoV-2)検出試薬キット(栄研化学)、Ampdirect 2019-nCoV検出キット(島津製作所)の使用施設での誤判定の影響が考えられた。

7) 試薬の薬事承認の有無と導入時性能評価では、参加施設全体と比較し、試薬の薬事承認が未取得の施設で、妥当性確認ありの割合は変わらず(参加施設全体32.9% vs 不一致施設29.4%)、試薬が薬事承認済の施設で検証ありの割合が上昇していた(参加施設全体22.6% vs. 不一致施設41.2%)。ただし、多くの施設において、検出限界などメーカー指定の性能評価を妥当性確認・検証せずに用いて運用していた。陽性・陰性の判定基準についても同様にメーカー指定の基準を用いていた。

8) 増幅検出プロセス評価用の陰性検体③、核酸抽出・増幅検出プロセス評価用の陰性検体⑥それぞれにおいて、偽陽性結果1、3施設(計4施設)の誤判定が見られた。その要因として、当該施設への聞き取りによれば、測定後の判定転記ミス(2施設)、検査の導入時の測定性能評価における陽性/陰性の判定指標の設定が適切でなかった可能性(2施設)が考えられた。後者の2施設では、測定試薬として、ダイレクトPCR測定試薬が用いられていた(後述)。コンタミネーションによる偽陽性は確認されなかった。

9) 偽陰性結果 14 施設における誤判定の要因として、当該施設への聞き取りによれば、試料の取り違い（陰性コントロール）の可能性が1施設で、判定確認ミスの可能性が1施設で考えられた。1施設では、装置の解析ソフトによる自動判定で陰性判定としたものの、増幅曲線の目視確認で立ち上がり(34Ct)が確認できたため、判定入力前の目視確認不足と考えられた。

その他の偽陰性結果の誤判定要因の多くは、検出限界の未確認または再現性不良が考えられた。試料別、測定試薬別に詳細を以下に示す。

核酸増幅・検出プロセス評価用の陽性試料②（50 コピー/アッセイ）で誤判定の施設について、装置と試薬の組み合わせでは、Loopamp EXIA/LF-160 と Loopamp(SARS-CoV-2)検出試薬キット（栄研化学）の組み合わせが7施設中3施設で用いられていた。より濃度の高い陽性試料①（100 コピー/アッセイ）ではこれらは正しい判定を行っていたため、測定性能として検出限界の再現性が確保できていなかった可能性が考えられた。

そのほか、陽性試料②について誤判定となった施設においては、測定試薬として LightMix Modular SARS-CoV(COVID19)の使用で、測定装置/核酸抽出システムとしてはコバス z 480（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）/ King Fisher（サーモフィッシャーサイエンティフィック）が1施設、QuantStudio5/5Dx リアルタイム PCR システム(サーモフィッシャーサイエンティフィック) / QIAcube（キアゲン）が1施設で見られた。これらの施設においても、陽性試料②の判定に必要な検出限界・分析感度を確保できていなかった可能性が考えられた。また、後者においては試薬非推奨機器を用いたことによる影響も考慮する必要性がある。

ダイレクト PCR 測定試薬使用の施設において、核酸抽出・増幅・検出プロセス評価用の陽性試料④（50 コピー/アッセイ）で、偽陰性 4 施設の誤判定が見られた。測定試薬 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ）の使用施設では、測定装置として、7500Fast リアルタイム PCR システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、Takara Dice（タカラバイオ）、QuantStudio5/5Dx リアルタイム PCR システム(サーモフィッシャーサイエンティフィック)、LightCycler 96 /TaqMan48（ロシュ・ダイアグノスティックス）がそれぞれ1施設で用いられていた。同様のダイレクト PCR 測定試薬 Ampdirect 2019-nCoV 検出キット（島津製作所）では、LightCycler 96 /TaqMan48 が用いられていた（2施設）。

上述のとおり、増幅検出プロセス評価用の陰性検体③、核酸抽出・増幅検出プロセス評価用の陰性検体⑥それぞれにおいて、測定性能評価における陽性/陰性の

判定指標の設定が適切でなかったことに基づくと考えられる偽陽性2施設が見られた。検出限界・分析感度は、測定装置と測定試薬の組み合わせで異なるが、これらの施設では、判定基準にメーカー指定値の40Ctが一律に用いられていた。

偽陽性、偽陰性に共通する誤判定の要因として、施設における妥当性確認・検証が行われていないことや、その性能評価に基づく許容範囲の設定のもとで再現性を確保するための内部精度管理の実施が十分にされていないことが背景要因として考えられた。偽陰性の誤判定については、十分な検出限界・分析感度が確保できていないことも背景要因として考えられた。また、配布した試料の擬似ウイルスの核酸抽出効率の低下も一因として考えられた。

- 1 0) 2回測定にて再現性を確認する増幅検出プロセス評価用の陽性検体①、②において、定性再現性不良（陽性と陰性結果）がそれぞれ、1.3%(2/150)、5.3%(8/151)の施設に認められた。これらの施設では多い順に、Loopamp(SARS-CoV-2)検出試薬キット、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit、Ampdirect 2019-nCoV 検出キットが使用されていた。感染研法の使用施設では、定性再現性不良は見られなかった。施設カテゴリーの内訳は、衛生検査所3施設、医療機関2施設、保健所2施設、検疫所1施設であった。
- 1 1) 定量的指標 Ct の全体集計結果は、SDI（参加施設の値が平均から何倍のSD標準偏差分ずれているかを表す）分布について、 $SDI \leq 2$ 、 $2 < SDI \leq 3$ 、 $3 < SDI$ の3群に分けて、施設個別データとして報告した。PCR法使用の $3 < SDI$ の施設は、①1.1%(3/274)、②0.7%(2/271)、④0.0%(0/142)、⑤1.3%(4/312)であった。

III. 精度管理における留意点

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、精度管理実態調査と外部精度管理調査（技能試験スキーム）の集計結果（集計対象は 563 施設）について、評価を行なった。誤判定の要因は、測定プロセスに加えて、測定前・測定後プロセスに由来することが考えられた。測定プロセスにおいても、再現性不良の実態と背景が明らかとなった。「III. 精度管理における留意点」では、その調査結果を踏まえて、新型コロナウイルス PCR 検査等の精度を確保するために留意すべきことを以下に記述する。

1. 本外部精度管理調査の課題と対応

本外部精度管理調査の課題として、きわめて多様な測定システムについて調査と評価をする上での限界がある。測定装置と測定試薬の組み合わせた測定システムの多様性に加えて、核酸抽出方法の選択は、分析感度に大きく影響する。したがって、分析感度が大きく異なる測定システムを対象とした外部精度管理調査において、同一濃度の統一試料を用いた場合、評価対象外の測定システムや施設が多数となる恐れがある。実際に検出限界・分析感度は、精度管理実態調査の結果、自施設評価・メーカー公称値において、数～数 100 コピー/アッセイと 2 桁のオーダーの違いが明らかとなった。課題対応として、本外部精度管理調査では、増幅検出プロセスと核酸抽出・増幅検出の全プロセスを評価する 2 種類（それぞれ、異なる濃度の 3 試料）を用意し、多様な測定システムの評価を試みた。検出感度が大きく異なる全自動核酸増幅検査装置についての評価は、検出感度の劣る測定システムでも評価可能な十分なウイルス量（総量）の試料配布（試料④、⑤）にて行った。

測定装置と測定試薬の組み合わせで独立して取り扱う測定法群ピアグループは 18 グループが構築された。ピアグループが構築出来なかった 10 施設未満での使用装置・試薬を含めて、測定装置、測定試薬別に全体集計を示した。また、不一致判定の施設で使用していた装置と試薬の組み合わせで認められた事象を紹介した。

全自動核酸増幅検査装置を使用している場合、核酸抽出・逆転写・増幅検出の全プロセスを評価できたものの、フローが連続的に自動化されているため、増幅検出プロセス単独の評価を行うことが出来なかった。Loopamp® 新型コロナウイルス 2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キットを使用している場合、核酸抽出は喀痰検体を想定してカラム抽出法を行うこととした。しかしながら、多くの施設で簡易抽出法のみを使用し、カラム抽出法が実施出来なかった。このため、核酸抽出・逆転写・増幅検出の全プロセスの評価が出来ず、増幅検出プロセスのみの評価に留まった。検

出限界・分析感度は核酸抽出と増幅検出の組み合わせに依存するため、全プロセスでの評価が望まれる。この点については、「I.2.精度管理実態調査の結果」における検出限界の分布（核酸抽出方法別）の記述を参照されたい。

カラム等による核酸抽出精製を実施している場合（RT-PCR、LAMP 等）や簡易抽出法（ダイレクト PCR 等）にて RT-PCR を実施している場合において、増幅検出プロセスについて 2 回測定における精度（再現性）の評価を行った。一方、全自動核酸増幅検査装置を利用し実施している場合に関しては、試料は十分なウイルス量を確保するため、その容量は 1 回測定に必要な量に留まり、精度（再現性）の評価は実施しなかった。

全自動核酸増幅検査装置など専用システムを使用し実施している場合に関しては、核酸抽出方法別の検出限界の実態調査結果に示されたように、自施設における妥当性確認・検証にて性能評価している施設は限られていた。この点については、検査室の責任において、導入時の妥当性確認・検証または再確認が必要であるため、「2. 検査室での留意点」の記述を参照されたい。

本外部精度管理調査では、日常検査で主に使用の検査方法を対象として、1 施設に計 6 試料 1 セットを配布した。参加施設によっては、日常検査において複数の測定システムを用いている。大手の登録衛生検査所においては、複数の測定システムによる検査サービスを提供している。また一般に医療機関では、使用目的（感染症患者診療、夜間緊急時、無症状患者の入院時スクリーニング等）によって、異なる最小検出感度の複数の測定システムを用いている。本調査では、日常検査で主に使用の検査方法が評価されたものの、緊急時等に用いる全自動核酸増幅検査装置など POCT 仕様の測定システムについては、評価の実施が十分出来なかった。特に医療機関における感染症診療や院内感染対策では、日常検査と緊急検査の両者における検査の精度の確保が重要となる。核酸抽出方法別では、簡易抽出（LAMP 法）や専用システム・全自動核酸増幅検査装置が POCT 仕様の測定システムとして用いられる。しかしながら、自施設で性能評価を行っている比率が低かった。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・分析感度や精度（再現性）など測定性能を検証することが望ましい。

なお、この外部精度管理調査は単回の調査であり、継続的にモニタリングしたものではないため、この外部精度管理調査の結果のみで必ずしも参加施設の能力を評価できるものではないこと、また、この外部精度管理調査は、試薬・機器の組み合わせをはじめとした検査システム全体（検査室管理を含む）としての評価であって、この外部精度管理調査の結果のみで必ずしも各試薬・機器自体を評価できるものではないことに留意が必要である。

2. 検査室での留意点

1) 遺伝子関連検査における精度の確保

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、精度の確保に係る責任者の設置、標準作業書・日誌の作成、内部精度管理の実施、研修の実施が義務となる。偽陽性の発生リスクを最小限とし、発生した場合には早期に検知して報告を未然に回避する取り組みについては、検査室の内部精度管理の一貫として、日常的に実施することが望ましい。こうした取り組みは、測定前、測定、測定後の3つのプロセス毎にそれぞれ行われる。測定前プロセスにおいては検体の取り違いやクロス汚染の回避の取り組みが、測定プロセスにおいては、陰性コントロールとの同時測定が行われることが一般的である。カートリッジ方式、*N*-glycosyltransferase による増幅産物のキャリーオーバー汚染の影響回避など技術的な対応も可能である。測定後プロセスにおいては、核酸増幅曲線での目視判定、偽陽性が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）での再測定、転記ミスの回避を行った上で報告することが望ましい。キャリーオーバー汚染による偽陽性結果の回避には、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通行にすることも重要である。

偽陰性結果の回避についても、3つのプロセスにおける取り組みがそれぞれある。患者病期に適した検体種の選択指導（初期は鼻咽頭ぬぐい液や唾液、肺炎症状時は喀痰など）、検体採取タイミングの適正化（唾液検体における飲食の影響回避など）、内部コントロールとの同時増幅や核酸増幅曲線の確認などがある。

2) 検査導入時の性能評価（妥当性確認・検証）と再評価

薬事承認未取得の試薬（研究用試薬）を用いる場合は、検査導入時に、検査室の責任で、検査目的に合致した性能を評価し、必要な性能を確保しなくてはならない（妥当性確認）。薬事承認を取得した試薬を用いる場合においても、特に臨床検査室での導入時に性能評価が重要である（検証）。測定性能の項目として、検出限界・分析感度や精度（再現性）の評価は、低濃度（100 コピー/アッセイ）・超低濃度（50 コピー/アッセイ）の試料測定における測定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。測定性能

に関する用語と定義は、資料「測定性能評価に関する用語説明」を参照されたい。

陽性判定の基準としては、多くの施設で RT-PCR の場合は Threshold Cycle (Ct)値でメーカー指定値の 40 を用いていた。これらの施設において性能評価を実施していない場合は、改めて検出限界を含めた性能評価を行うことが重要である。

施設検査の導入時の測定性能評価として、妥当性確認・検証の実施にて、配布試料（50 コピー/アッセイ）を判定できる検出限界（10、20 コピー/アッセイ）を確認しているものの、偽陰性の誤判定となった施設が 2 施設認められた。検出限界、分析感度、分析特異性（分析的特異度）、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）の組み合わせ毎に測定する必要がある。検出限界の評価は、核酸抽出と増幅・検出の組み合わせた性能として評価する。

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い。アッセイデザインとしてプライマー・プローブ結合部位の変異による検出限界・分析感度の低下が指摘されている。検査導入時の性能評価で確認した検出限界は、ウイルスの変異に応じて適時再確認する必要がある。

精度（再現性）に関して、2 回測定にて再現性を知る増幅検出プロセス評価用の陽性検体①、②において、定性再現性不良（陽性と陰性結果）がそれぞれ、1.3%(2/150)、5.3% (8/151) の施設に認められた。これら施設では、改めて再現性を含めた性能評価を行い、手技（ピペット操作など）、測定試薬、測定装置などの原因の分析及び是正が必要である。

定量的指標 Ct の全体集計結果（SDI 分布）について、 $3 < \text{SDI}$ の施設は PCR 法使用施設で①1.1%(3/274)、②0.7%(2/271)、④0.0%(0/142)、⑤1.3%(4/312)であった。Ct 値は測定試薬・装置の組み合わせにより異なるため、標準化できるものではないが、 $3 < \text{SDI}$ の施設群においては、こうした偏位が誤判定の要因になっていると考えられる場合には、施設で利用する測定システム（核酸抽出、測定装置、測定試薬など）の特性に基づき、系統的誤差要因について検討する。

表 11. 誤判定の要因と対策

誤判定の要因	要因	対策
陽性の判定基準の設定	検出限界の再現性不良、 検出限界・分析感度、分析 特異性、判定基準のメーカ ー指定値使用（Ct40 など）	妥当性確認・検証の実施による検出限 界・分析感度の確保に基づく、判定基 準の設定
検出限界・分析 感度不足	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） 測定性能に基づく許容範囲の基準設定 に基づく内部精度管理
偽陽性結果	増幅産物のキャリアオーバ 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
偽陰性結果	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確認

3) 内部精度管理

内部精度管理の実施内容では、コントロール測定は、ラン毎回または1日1回の頻度で行う。内部精度管理自体は全ての施設で行われていたが、許容範囲

の指標と基準（内部標準）については、23.3%（131/563施設）において設定基準の記載がなく、統計学的な許容範囲を定めた上での内部精度管理が実施されていない可能性が示唆された。統計学的な内部精度管理は、測定システムの安定による精度（再現性）を確保する上で重要である。陽性コントロールの Ct 値や Tt 値を用いて、統計学的な内部精度管理を実施することが望まれる。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、各プロセスで患者検体と同じ挙動プロセスをモニターすることが望ましい。

4) 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、工程（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。

外部精度管理調査では、試料の測定自体のみならず、測定前プロセスの試料の取扱いから測定後プロセスの判定・報告まで、日常検査と同じ流れでの一連のプロセスを評価する。偽陽性判定の要因として、核酸増幅曲線での目視判定ミス、陽性コントロールや隣の試料の測定結果の転記ミスが見られた。測定前プロセスにおいても、試料の取り違いに基づく偽陰性判定の報告が見られた。検体確認ミスや転記ミスは、日常検査において、起きうる事象である。報告時の人為的ミスによる誤判定報告を未然に防ぐには、管理システムの構築（二重チェック体制、測定標準作業書への記載と遵守など）が必要である。その点で、標準作業書の作成と現場での利用は、適正な検査を行う上で必須である。

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」を盛り込む。並びに、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。測定標準作業書は、検査機器等の取扱説明書等で代替することとしても差し支えない。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き運用することが望ましい。

測定標準作業書には、検出限界・分析感度など導入時の妥当性確認・検証に基づく、許容範囲の設定と内部精度管理に関する作業手順の記述を含める。測

定性能、特に検出限界・分析感度や精度（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。

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。遺伝子分析科学認定士、認定臨床微生物検査技師など遺伝子や微生物の専門資格の有無は、不一致施設においても、参加施設全体と同様の割合であった。これら専門資格の取得後においても、精度の確保に係る継続的な研修の実施が必要である。特に、薬事未承認の測定システムの性能評価（妥当性確認、検証）など運用導入における基本的知識の習得は重要である。

6) 検査室の能力

薬事未承認等の測定システムの性能評価（妥当性確認、検証）は、運用導入を考慮する臨床検査室の責任で行い、また妥当性確認による性能評価に基づく内部精度管理と許容範囲の設定が必要となる。その際、日本臨床検査標準協議会 遺伝子関連検査標準化専門委員会「遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイドンス文書」（2019年発行）が参考となる。また、薬事承認済の試薬であっても、使用する検体種の変更や拡大など手順の変更においては、臨床検査室の責任で妥当性確認を行う必要がある。薬事承認された体外診断薬においても、結果判定には、その判定域値での再現性（日差を含めた）に基づくことが求められる。特に低いコピー数のウイルス検出の信頼性は、運用導入時（ウイルス進化によって必要時）に検査室の責任で検証する必要がある。

新型コロナウイルス核酸検査は、多項目検査に相当する。検出対象として、遺伝子領域（N, S, E, RdRP, Orf1a 等）の同時検出に加えて、増幅阻害因子をモニターする内部コントロールを組み込んだ測定システムもある。多項目検査の精度の確保は、測定の複雑さ（プライマー同士の干渉や各検出標的の分析感度の違いなど）から、単項目検査と比べて難度がきわめて高くなる。これに関しては、国際規格 ISO 21474「体外診断用医薬品・医療機器-核酸用の多項目分子学的解析」の文書シリーズや開発中の ISO/AWI TS 5798「核酸増幅検査を用いた SARS-CoV-2 検出の品質実践」が参考となる。

3. 測定装置・試薬の各製造販売業者の留意点

1) 性能評価

装置、試薬別に正答率を見ると、装置と試薬の組み合わせで18のピアグループの内、装置と試薬の薬事承認等の有無の組み合わせで見た場合、両者が薬事承認等済でない場合でも正答率は高く、薬事承認等の有無は、正答率との関係で明らかな傾向は見られなかった。装置と試薬の組み合わせでは、Loopamp EXIA/LF-160 と Loopamp (SARS-CoV-2)検出試薬キット（栄研化学）の組み合わせで測定の場合、核酸増幅・検出プロセス評価用の超低濃度（50 コピー/アッセイ）の陽性試料②にて、不一致判定（偽陰性）が見られた。その背景要因として、検出限界・分析感度の未確認、再現性不良あるいは分析感度不足が示唆された。

測定試薬 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ）や Ampdirect 2019-nCoV 検出キット（島津製作所）などダイレクト PCR 測定試薬使用の施設において、核酸抽出・増幅・検出プロセス評価用の超低濃度（50 コピー/アッセイ）の陽性試料④で、偽陰性3施設の誤判定が見られた。また、増幅検出プロセス評価用の陰性検体③、核酸抽出・増幅検出プロセス評価用の陰性検体⑥それぞれにおいて、測定性能に基づくと考えられる偽陽性2施設が見られた。ダイレクト PCR 法の使用において、検出限界・分析感度や陽性の判定基準は、使用する測定装置との組み合わせで異なる。このため、検査導入時に、各検査室での責任にて、妥当性確認・検証に基づき、適切に性能評価と判定基準の設定と運用が必要となる。

2回測定にて再現性を知る増幅検出プロセス評価用の陽性検体において、定性再現性不良（陽性と陰性結果）であった施設では多い順に、Loopamp(SARS-CoV-2)検出試薬キット、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit、Ampdirect 2019-nCoV 検出キットが使用されていた。対照方法として感染研法の使用施設では、定性再現性不良は見られなかった。

以上の点を踏まえて、各製造業者においては、検出限界・分析感度と精度（再現性）等の性能評価の再確認および性能の安定性確保の検討が必要と考えられる。

ミュータスワコーg1・試薬ミュータスワコー COVID-19（富士フィルム和光純薬）での測定の場合、参加した全16施設で誤判定（偽陰性）の報告となった。試料の取扱説明書では、配布試料の全量をスワブで吸着して日常検査と同様に測定をするよう記載した。参加施設の多くでは、配布試料の全量でなく、スワブ1回で吸着した量（約40 μ L）を使用し、専用懸濁液1,000 μ Lに添加

していた。製造業者から、懸濁液でなく、次の操作ステップの前処理液への全量添加が望ましいとの連絡のもと、試料取扱説明書の記載を急遽変更した。調査の結果、それに従った施設が過半数と判明した。後日に行なった実験の結果、前処理液への試料の直接添加では、偽陰性結果となることが判明した。原理的にも、測定前の RNA 抽出プロセスを評価するためにウイルス骨格（擬似ウイルス）を用いた試料は、懸濁液でのウイルス溶解と RNA 放出・安定化の操作が必要で、前処理液（RNA 純化）へ直接添加した場合、RNA 抽出効率が大幅に低下すると考えられる。本システムでの偽陰性判定の要因としては、試料の取扱いが適切に使用されなかった他、測定システムにおける検出限界がメーカー公称値（150 コピー/アッセイ）より不良である可能性が考えられた。今回の調査で配布した核酸抽出・増幅検出プロセスを評価する低濃度陽性試料⑤は、核酸抽出から増幅検出までの全自動測定装置を用いた測定システムの使用施設をも対象とした。ウイルス濃度 20 コピー/ μL の試料 150 μL で、全ウイルス量は 3,000 コピーとなる。今回の調査において、3000 コピー/150 μL 全量を 1,000 μL の専用懸濁液に添加した場合、懸濁液を前処理液に使用するウイルス量は十分と想定される。

これらから、各製造業者において、患者検体でのマトリックス存在下での測定性能の再評価が必要と考えられた。また、検出限界・検出感度の評価は、核酸抽出と増幅検出を組み合わせた測定の全プロセスでの評価が必要である。

2) 測定試薬等の薬事承認及び利用者への情報提供

新型コロナウイルス核酸検査の需要が高まっている状況において、薬事承認済以外の測定試薬のうち一部を緊急的に認めている状況であるが、装置と試薬の薬事承認等の有無の組み合わせで見た場合、両者とも薬事承認等済でない場合でも正答率は高く、薬事承認等の有無は、正答率との関係で明らかな傾向は見られなかった。ただし、試薬の品質管理等の観点からは、薬事承認された試薬の使用が望ましい。薬事承認された多くの試薬においても、緊急的措置として、「承認時のデータが極めて限られていることから、製造販売後に臨床性能を評価可能な適切な試験を実施すること」と条件が付けられている。各製造販売業者においては、薬事承認申請に必要な性能評価において、また製造販売後の臨床性能の評価において、1) 「性能評価」に記載された事項を考慮することが望まれるとともに、利用者（検査室）に対して測定性能に関する適切な情報提供に努めることが求められる。さらに、検査室が信頼性ある測定と結果の

報告が可能となるように、測定装置・試薬の運用上の必要な情報提供、必要に応じて装置の保守管理を含めた技術的支援を行うことが重要と考えられる。

おわりに

新型コロナウイルス感染症の PCR 法等の核酸検査は、様々な施設において、異なる機器・試薬・手技によって行われており、その精度確保への取り組みは、測定結果の信頼性を左右する。その実態は、本事業において、精度管理実態調査と外部精度管理調査の集計の詳細な分析と評価に基づき明らかとなった。また、本報告書において、今回の調査にて明らかとなった精度の確保における実態に基づき留意すべき点についても記述した。本調査において見られた測定結果の誤判定報告は、成績良好であった参加施設においても日常検査で起きうる事象である。また、誤判定に至らないまでも、定性結果の再現性不良や定量的指標における外れ値を示した施設も少なからず認められた。各検査実施機関においては、本報告書の内容に基づき作成された「精度管理マニュアル」を参考にし、継続的な検査の精度の確保のもとで、正しい検査結果の提供に努めていただきたい。

【資料：測定性能評価に関する用語説明】

1) 測定性能評価（性能特性の確認）

検査室は、測定性能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（分析感度）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。薬事承認未取得の試薬（研究用試薬）を使用する場合は、検査導入時に、検査室の責任で、検査目的に合致した測定性能を評価し、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、試薬が薬事承認済の場合でも、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）を検証しなければならない。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。

薬事承認等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、分析測定結果の真度（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성에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する。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することが望ましい。

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)

検査工程 (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、検査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/siryō/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.