

[総 説]

病原体核酸検査の精度管理—SARS-CoV-2 を中心に—

青木弘太郎・石井良和

東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(令和 3 年 12 月 28 日受付)

中国の武漢で発生した原因不明の肺炎病原体は、次世代シーケンシング解析により全ゲノム配列が明らかとなり、2020 年 1 月に公開された。その病原体は severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) と呼ばれ、全ゲノム配列情報に基づいて reverse-transcription TaqMan real-time PCR や等温増幅法による核酸増幅法（以下、PCR 検査）が迅速に構築された。現在、PCR 検査は新型コロナウイルス感染症に係る病原体核酸検査として世界中で汎用されている。これまでに、多数の SARS-CoV-2 PCR 検査法が開発・使用されているが、その性能は均一ではない。任意に試薬を組合せて構築される自家調製検査法は、その性能の妥当性を確認して使用しなければならない。検査前、検査、検査後プロセスのうち、多くの PCR 検査で使用されるキットは検査プロセスが商品として発売されており、研究使用限定試薬あるいは体外診断用医薬品であっても、任意の核酸抽出法と組合せる場合はその妥当性の確認が必要である。検査実施施設は検査の質を確保するため、日々の内部精度管理により問題点を早期に察知・是正し、外部精度管理に積極的に参加して自施設の検査レベル向上に努めることが重要である。

Key words: SARS-CoV-2, PCR, RT-qPCR, 内部精度管理, 外部精度管理

はじめに

病原体核酸検査による感染症診断は、患者検体中に含まれる病原体に起因する特徴的な核酸塩基配列を、PCR に代表される核酸増幅法やハイブリダイゼーション法などにより検出する検査法である。病原体核酸検査は、培養を介さずに目的の病原体の存在の有無を感度および特異度良く確認できることから、培養に長時間を要する、培養が困難、あるいは培養不能である病原体の検出などに威力を発揮してきた。また、病原体核酸検査は、薬剤耐性遺伝子あるいは病原遺伝子の検出にも応用され、病原体の特徴づけや疫学調査にも汎用されている。

2019 年 12 月に中国の武漢で原因不明肺炎が流行し、2020 年 1 月にはその原因ウイルスの severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2: 新型コロナウイルス) 全塩基配列が次世代シーケンサーを用いた患者検体の網羅的病原体ゲノム解析により決定された¹⁾。Coronavirus disease 2019 (COVID-19: 新型コロナウイルス感染症) に係る検査は、SARS-CoV-2 の全塩基配列をもとに、ヨーロッパと中国の研究グループが早く TanMan プローブを用いた reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR 検査) を構築及び公表し¹⁾²⁾、本邦においても国立感染症研究所が独自の RT-qPCR 検査法を構築（感染研法）し公開した³⁾。

東邦大学医学部微生物・感染症学講座（当教室）では、核

酸抽出から RT-qPCR による標的の検出までの工程を自動化できる BD MAX™ (Becton, Dickinson and Company; BD Life Sciences, MD, USA) に感染研法を搭載した検査のための標準手順書を日本臨床微生物学会のホームページを通じて公開した（初版：2020 年 2 月 20 日、改訂版：2020 年 4 月 28 日）⁴⁾。その後、当教室は COVID-19 に係る RT-qPCR 検査のみを行う臨時的衛生検査所として登録した。

本稿では、病原体核酸検査の精度管理について当教室での SARS-CoV-2 RT-qPCR 検査の立ち上げおよび運用の経験をもとに纏める。

検査工程と精度管理

病原体核酸検査の工程

PCR に代表される病原体核酸検査の工程は、検査前、検査、および検査後の 3 つのプロセスに大別される（表 1）。クロスコンタミネーションを防止するため、検体処理、核酸抽出、核酸増幅検査試薬調整、および核酸増幅操作を行うスペースは分け、一方向性を確保しなければならない。また、核酸増幅産物が新たに行われる検査系へ混入することは偽陽性の原因になるため、増幅工程終了後のチューブの蓋は決して開けない。RNA をゲノムにもつ病原体を検出するための PCR 検査には、RNA を complementary DNA (cDNA) に変換する逆転写 (reverse-transcription, RT) プロセスが必要である。これらの理由から、検査実施者は 1 つのチューブ内で RT を経て DNA の増幅工程を行う、one step RT-qPCR などを原理とする検査法が一般的に採用されている（図 1）。

内部精度管理

内部精度管理は日常検査の一環として行うものであり、検査データが適切であることを自ら検証する作業である。各施

著者連絡先：〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部微生物・感染症学講座
石井良和
TEL: 03-3762-4151 (内線 2396)
E-mail: yishii@med.toho-u.ac.jp

設において精度管理標準品を用いて検出限界（Limit of Detection：LOD）に近い濃度を検査バッチ毎（検査実施毎）に測定しなければならない。各施設で精度管理に用いる試料は、すでに使用したい濃度に調整されている精度管理標準品を準備することが望ましい。得られた検査バッチ毎の精度管理標準品の Threshold Cycle (Ct) 値はグラフにプロットする（図2）。予め設定した許容範囲内に測定値が収まっていることを確認し、測定値が許容範囲外であったり、トレンド誤差を認めたりした場合は、その原因を明らかにし、検査方法などを是正する。

病原体核酸検査において低濃度領域検出の精度管理は重要である。精度管理標準品を自ら希釈した場合、希釈液に含まれる DNA あるいは RNA 分子数はポアソン分布に従うため一定ではない。株式会社リコーは、この問題を解決するためバイオプリンティング技術を応用し⁵⁾、1分子レベルでの正確な精度管理標準品作製方法を開発し、製品として市販している（RICOH Standard DNA Series⁶⁾。したがって、様々な要因で発生する分注誤差（図3）を考慮せずにPCR検査の検出限界付近を信頼性高く評価することが可能である。本製品は、現時点ではテンプレートはDNAであるが、今後はテンプレートがRNAとしても提供されることに期待したい。

表1. 病原体核酸検査の工程

プロセス	内容
検査前	被検者の問診 検体採取 検体搬送 検体受付
検査	核酸抽出 核酸増幅 増幅産物検出
検査後	データ解析 結果判定/解釈 報告

筆者作成。

外部精度管理

外部精度管理調査は、各施設において行われる検査が適切に行われているのかの実態を調査し、その受検結果が定められた許容範囲を逸脱する場合には、自施設で是正あるいは外部精度管理実施主体が是正に支援をするために行われる。海外では欧州連合やオーストリア、韓国で行われた外部精度管理調査の結果が報告されている^{7)~11)}。多種多様な検査用試薬とその組み合わせが採用されており、いずれの報告でも低濃度サンプルにおける測定結果の一致性が良くないことから、検査の標準化が望まれている。それに加えて、我々はその外部精度管理調査に用いる精度管理標準品の調整方法を含む調査自体の標準化も必要であると考えている。

2021年12月までに当教室がSARS-CoV-2の病原体核酸検査のみを行う臨時の衛生検査所として、2020年および2021年にそれぞれ厚生労働省（厚労省）および東京都が実施した外部精度管理調査を受検した¹²⁾¹³⁾。これらの調査では、検査前プロセスから検査後プロセスまでの一連の工程の内部精度管理に用いられる市販のフルプロセスコントロール試料を任意の濃度に調整したものを配布している。SARS-CoV-2 PCR検査のフルプロセスコントロール試料は、原稿執筆時点（2021年11月）で5社から市販されているものが利用可能である（表2）。受検施設は、配布された試料について、日常的に実施している検査方法に従ってSARS-CoV-2に対するRT-qPCR検査を実施して結果および解釈について報告した。なお、報告の際には各施設の概況等のアンケートも実施された。東京都および厚労省の精度管理調査のアンケートの一部を表3に示した。

外部精度管理の成績が良くない施設は原因究明と改善が必要である。当教室が厚労省の外部精度管理を受検した際に誤回答の指摘を受けたことと、その結果を受けての是正について共有したい。当教室の検査法は感染研法のN2を標的としたいわゆる自家調製検査法（Laboratory developed test：LDT）である。当教室では、自家調整RNA（後述）を内部精度管理用試料として使用しており、LODをCt値35.0未満と定めていた。配布試料のCt値は、35.0および35.1であっ

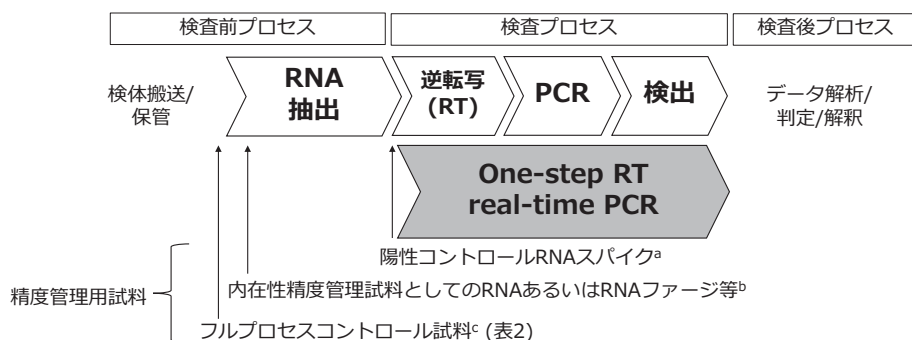


図1. SARS-CoV-2 PCR 検査プロセスと精度管理試料

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フルプロセスコントロール試料は、SARS-CoV-2 PCR検査の標的を有し、核酸抽出から検出、判定までの全行程を評価できる。市販されているフルプロセスコントロール試料情報は表2に示した。

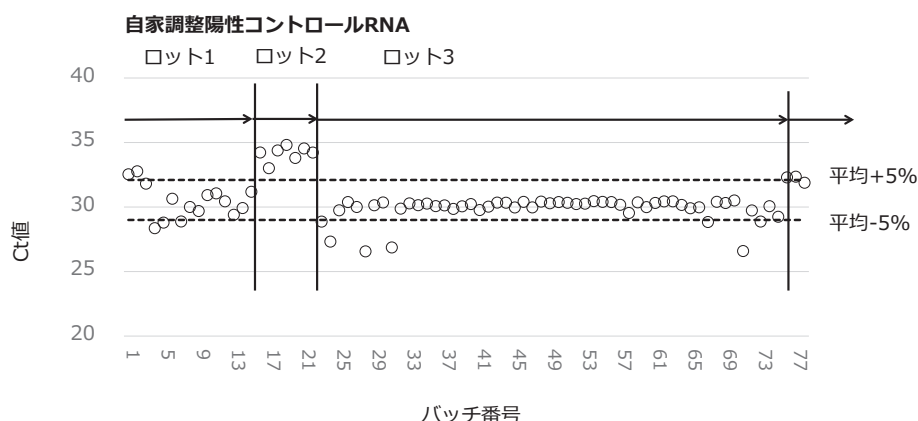


図2. 各バッチで測定した内部精度管理試料のCt値

東邦大学医学部微生物・感染症学講座で実施したSARS-CoV-2 PCR検査（感染研法セットN2）における内部精度管理試料測定時のCt値をプロットした図。平均Ct値から±5%以内を精度管理限界と独自に定め、内部精度管理試料のCtがそれを逸脱した場合には、再検あるいは検査手法の見直しを検討する。内部精度管理試料は自家調整陽性コントロールRNAであり、約100コピー/PCRとなるように供試した。偶発的あるいは自家調整陽性コントロールRNAのロット変更時の精度管理限界の逸脱が観察された。

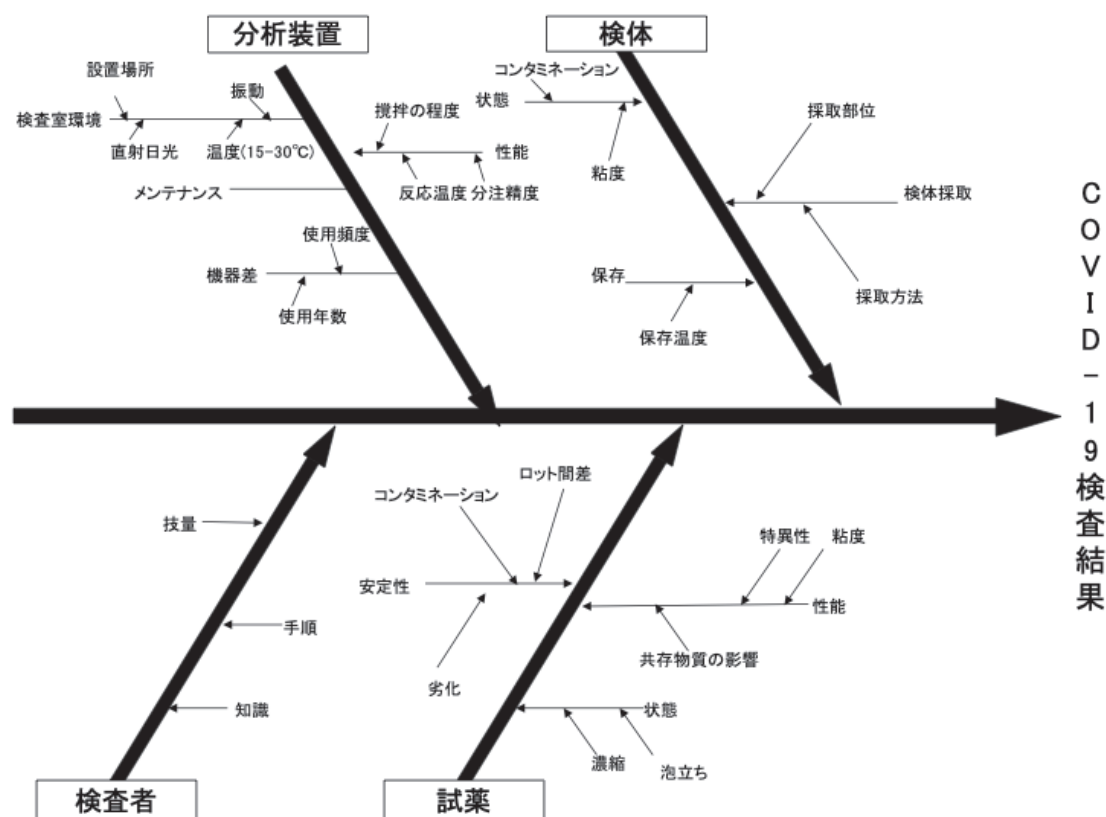


図3. PCR検査の測定不確かさにおける特性要因図（フィッシュボーンダイアグラム）

SARS-CoV-2 PCR検査の測定の不確かさの要因を示した図。大きく4つ（検査者、分析装置、試薬、および検体）の要因があり、さらにそれぞれに要因が細かく挙げられる。検査結果に与える影響が可視化され、問題点が整理しやすい。

たため、当教室の判定基準にもとづいていずれも陰性と報告した。しかし、これらは精度管理実施主体では陽性試料として配布していた。当教室は、検査法を是正する目的で、LODの確認に供した自家調整陽性コントロールRNAの濃度をdigital PCR (dPCR) により検証したところ、塩基長と蛍光

光度法による濃度から算出したRNAコピー数を過小評価していた。すなわち、計算上10コピー/PCRを下回るサンプルの増幅シグナルを偽陽性と解釈し、LODをわずかに高めに設定していた。これらの結果を踏まえて当教室では、Ct値39.0未満を陽性とするように判定基準を改めた。

表 2. 市販されているフルプロセスコントロール試料一覧

メーカー	製品名	性状	特徴
SeraCare TM Life Sciences, Inc.	AccuPlex TM シリーズ	液体（冷蔵）	SARS-CoV-2 ゲノムの一部を組み複製能力を欠損させた α ウイルス
Randox Laboratories	Qnostics シリーズ	液体（凍結）	不活化 SARS-CoV-2
Thermo Fisher Scientific	AcroMetrix TM シリーズ	液体（凍結）	不活化 SARS-CoV-2
Microbiologics [®]	Helix Elite TM シリーズ	乾燥スワブ/ペレット	不活化 SARS-CoV-2
ZeptoMetrix [®]	NATrrol TM シリーズ	液体（冷蔵）	不活化 SARS-CoV-2

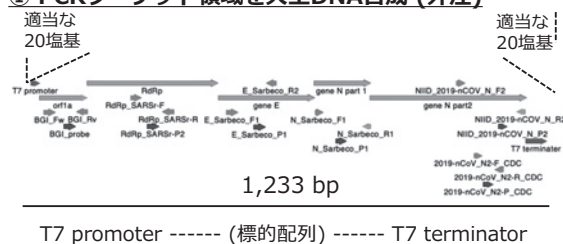
筆者作成。

表 3. 厚生労働省および東京都が実施した外部精度管理事業で問われた項目の一覧

カテゴリ	項目
試験実施概要	検査機関カテゴリー 行政検査の有無 自費検査の有無 陰性証明書発行有無
担当者	実験実施者と資格 データ責任者と資格 遺伝子関連・染色体検査の精度の確保に係る責任者
試薬及びケミストリー	測定機器 検体採取関連 RNA 抽出法 測定原理 測定試薬 検出標的 内部コントロール 陽性コントロール 陰性コントロール 測定回数 ルーチンの所要時間 最小検出感度（検出限界値） プール検体の検査実施
導入時の性能評価	妥当性確認 検証
内部精度管理の実施内容	試料入手方法 メーカー 製品名 頻度 管理限界の指標と基準（陽性） 許容範囲の指標と基準（陰性, non-template control）
サンプル関連	種類 測定標準作業書作成の有無と内容 検体取違い防止
検査実施状況	偽陽性回避 偽陰性回避 精度確保 要員研修/基本的知識 要員研修/基本的技能
施設第三者認定・認証	認定・認証項目
受託件数/日	平均・最大
結果判定	陽性の判定指標と基準 陰性の判定指標と基準
判定結果	陽性・陰性 Ct 値などの指標 考察

厚生労働省および東京都が実施した外部精度管理事業の受検経験から筆者作成。

① PCRターゲット領域を人工DNA合成 (外注)



T7 promoter ----- (標的配列) ----- T7 terminator

② In vitro transcription

In vitro Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) (TaKaRa) の取扱説明書に従い、1本差RNAを取得

③ DNA消化～RNAの精製

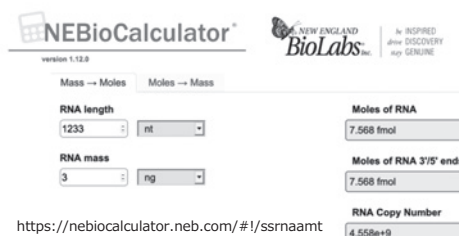
DNaseによりテンプレートDNAを消化後、RNAClean XP (BECKMAN COILTER) によりRNAを精製

④ RNAの濃度測定

Qubit®等の蛍光光度法によりRNA濃度の測定

⑤ RNA分子数の算出

RNA長と濃度から分子数を算出



<https://nebiocalculator.neb.com/#/!/ssrnaamt>

⑥ 希釈、分注して保存

Carrier RNAを添加したDEPC水で希釈
5～10μLずつに分注して-80℃に保存 (使い切り)

図4. In vitro transcription による自家調整陽性コントロール RNA の作成

PCR 標的部分のみを切り出して直列に並べ、人工遺伝子合成サービスによりテンプレート DNA を入手した。この際、in vitro transcription に必要な T7 promoter と T7 terminator の配列も合わせて付加した。本方法により得られた陽性コントロール RNA は1分子上に複数の PCR 検査キットの標的を集積させることができるため、横並びにキットの性能を評価できる利点がある。

精度管理の対象とその精度管理試料

RT を含めた検査プロセスの内部精度管理を実施するためには、DNA ではなく RNA を精度管理試料として用いる必要がある。一部のキットでは、検査前プロセスに当たる RNA 抽出工程が適切に実施されたことを確認する内在性精度管理試料として、SARS-CoV-2 ゲノムとは異なる RNA を内包した粒子や RNA をゲノムにもつバクテリオファージが用いられる (図1)。

当教室では、2020 年 2 月に横浜港に入港したダイヤモンド・プリンセス号の乗員乗客と空港検疫での RT-qPCR 検査を分担するため、早期に検査体制を構築する必要があった。しかしながら、当時は適切な陽性コントロール RNA の入手が困難であった。また、複数の PCR 検査試薬や機器が次々と市販される中で、一部の検査法で偽陰性事例が複数報告されたことから、複数の検査法の性能を適正に評価することが求められた。当教室では複数の PCR 検査の標的塩基配列が1つの RNA 分子上に搭載された自家調整 RNA 精度管理試料を in vitro transcription により作成できる DNA 断片をデザインした (図4)。その作成方法の概要は、①自家調整 RNA 精度管理試料に含める塩基配列を T7 promoter と T7 terminator で挟み、人工 DNA 合成受託サービスに委託して DNA として入手、②①で合成した DNA をテンプレートとして、In vitro Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) (タカラバイオ、滋賀) により一本鎖プラス鎖 RNA を取得、③DNase によりテンプレート DNA を消化後、磁性ビーズ試薬である RNAClean XP (BECKMAN COILTER, カリフォルニア、米国) により RNA を精製、④蛍光光度法を原理とする Qubit® により RNA 濃度を定量、⑤RNA 塩基長と濃度から RNA 分子 (コピー) 数を算出、⑥Carrier RNA を添加したヌクレアーゼフリー水で任意の濃度まで希釈、⑦希釈した RNA 溶液を分注して-80℃ で保存 (再凍結はしない) であ

る。当教室では、約 100 コピー/PCR になるように調整した自家調整 RNA 精度管理試料は、各 RT-qPCR 検査バッチの内部精度管理および日差再現性の確認に供している (図2)。

精度管理試料の検証

市販の精度管理試料の添付文書およびラベルには、1 mL あたりのウイルス濃度が記載されている。しかし、これらのウイルス濃度測定法は標準化された単位でないことから一律に比較することは出来ないと考えた。当教室で、AccuPlex シリーズ (SeraCare) と Qnostics シリーズ (RANDOX) の、それぞれ “10,000 cpies/mL” および “10,000 dC/mL” と記載がある試料を dPCR に用いて比較した (表2)。同じ手順で核酸抽出・逆転写の後、感染研法 セット N2 を用いて標的分子数を絶対定量した (表4)。その結果、Qnostics は AccuPlex と比較して標的 RNA が約 7 倍多かった。異なる企業が提供するフルプロセスコントロール製品はゲノム量に差異があり、精度管理の結果に影響を与える可能性に注意が必要である。また、セット N2 標的コピー数の差異の理由として、フルプロセスコントロール試料の作成方法の違いが考えられる (表2および表4)。AccuPlex は疑似ウイルスに SARS-CoV-2 ゲノムを組換えた製品である。従って、1 ウイルスパーティクル中に1コピーの N2 領域を含む SARS-CoV-2 ゲノムが含まれている。一方、Qnostics は不活化した SARS-CoV-2 そのものであることから、ウイルスの複製過程で生じる不完全なゲノム RNA (サブゲノム RNA : SARS-CoV-2 ゲノムと同様の一本鎖プラス鎖 RNA) をフルプロセスコントロール製品中に含む可能性がある¹⁴⁾¹⁵⁾。したがって Qnostics のみならず、不活化によって作成されたフルプロセスコントロールや患者検体には、ゲノム RNA とサブゲノム RNA が混在し、その両者が RT-qPCR 検査および dPCR で検出される可能性がある。

表 4. フルプロセスコントロール試料の dPCR による検証

項目	フルプロセスコントロール試薬（メーカー）	
	Qnostics（RANDOX）	Accuplex™（SeraCare）
仕様	不活化 SARS-CoV-2	α ウイルススペースの組替えウイルス
表記されたコピー数	10,000 dC/mL	10,000 copies/mL
核酸抽出供試量*1	140 μL	140 μL
核酸抽出溶出量*1	50 μL	50 μL
抽出核酸の逆転写への供試量*2	5 μL	5 μL
逆転写産物の dPCR への供試量*3	5 μL	5 μL
dPCR によるセット N2 検出コピー数*3	約 4,000 copies	約 550 copies

フルプロセスコントロール試料からの RNA 抽出、逆転写、および dPCR の主な操作は添付文書に従って実施した。dPCR の標的は感染研法のセット N2 で、プローブの標識は FAM である。

*1 QIAamp Viral RNA mini kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を使用。

*2 PrimeScript™ II Reverse Transcriptase（TaKaRa）を使用。

*3 QuantStudio™ 3D Digital PCR Reagent Kit（Thermo Fisher Scientific）および QuantStudio 3D digital real-time PCR system（Thermo）を使用。

表 5. PCR 検査試薬による区分

区分	性質	妥当性の確認
Laboratory developed test（LDT） Research use only（RUO）	検査室あるいは研究室等において任意に試薬を組合せて構築された検査 メーカーにおいて任意の試薬を組合せて構築され、その性能の妥当性が確認され た検査試薬キット	ユーザー 製造元
In Vitro diagnostics（IVD）	RUO の性質に加えて、規制当局の承認を得て製造販売される検査試薬キット	製造元

筆者作成。

表 6. 検査の妥当性の確認に用いられる主な項目

項目	項目の対訳	定義の対訳
Precision	精度	規定の条件で得られた独立した試験結果の一致の緊密さ
Linearity	直線性	試験試料中の分析物の濃度（量）に正比例した結果が得られる能力
Accuracy	真度（正確さ）	検査結果と受け入れられた基準値との一致度
Limit of detection（LOD）	検出限界	所定の測定手順で得られた測定量の値であって、材料中のある成分が存在しないと誤 認する確率が 0.05 である場合に、その成分が存在すると誤認する確率が 0.05 である もの
Limit of quantification（LOQ）	定量限界	分析法で規定された実験条件のもとで、統計的に妥当な確実性をもって一貫して測定 できる、定義された量のマトリックスあたりの分析対象物の最低濃度または含有量

Precision, Linearity, および Accuracy は文献（30）から、Limit of detection は文献（31）から、および Limit of quantification は文献（32）から引用し、項目および定義の対訳は筆者が翻訳して付した。

検査試薬の区分とその妥当性の確認

検査は LDT, 研究使用限定（Research use only：RUO）試薬による検査、および体外診断用医薬品（In vitro diagnostics：IVD）による検査の 3 つに区分される（表 5）。例えば、感染研法は LDT に該当する。LDT は、一般的に論文などを参照しプライマーおよびプローブ情報を基に任意の受託サービスを利用してオリゴヌクレオチドを合成し、任意の PCR 試薬（reverse-transcriptase, DNA polymerase, buffer, および dNTP など）、チューブ、および任意のサーマルサイクラーを組み合わせることで実施される。したがって、構築した検査系が目的の性能を発揮するのかどうかを、検査者が自ら妥当性を確認しなければならない。

妥当性の確認に必要な主要項目を表 6 に示す。それらのうち、当教室では精度、直線性範囲、および検出限界を確認した。これらの項目は個別に確認するわけではない。例えば、

LOD を求める際には、陽性シグナルが得られる境界濃度を確認する際、直線性も同時に確認できる。また、LOD の確認には、同一濃度の試料を 20 回以上測定しなければならないので、同時に精度の確認も実施できる。SARS-CoV-2 PCR 検査に限らないが、使用するサーマルサイクラーのウェル間の増幅効率の違いも、同一試薬とテンプレートを用いて把握する必要がある。また、複数のサーマルサイクラーを使っている施設では、装置間の増幅効率の違いについても確認する必要がある。

核酸抽出効率を含めた妥当性の確認にはフルプロセスコントロール試料を用いなければならない。また、核酸抽出工程には検体種が大きく影響することから、その評価には、検体種ごとのマトリックスを用いてフルプロセスコントロール試料を希釈すべきである。残念ながら、市販のフルプロセスコントロール試料が高価であること、均質な検体マトリックス

を大量に入手することは困難であることから、各施設で検査の妥当性確認で利用できる状況にはない。そのような限界があることを認識しつつ、LDTを立ち上げて、運用するためには、各検査室においてできる限り妥当性を確認することが必要である（表6）。

LDTとは異なり、RUOあるいはIVDキットは、メーカーがその妥当性確認をしている。しかし、その妥当性の確認方法はメーカーごとに異なることから、添付文書に記載された判定基準等をそのまま利用できない可能性がある。偽陽性は、被検者に不要な隔離や必要のない治療などの不利益を与えることに繋がる。したがって、RUOおよびIVDキットであっても、自施設でその試薬の性能を検証し、客観的な根拠をもって試薬を採用する必要がある。なお、国立医薬品食品衛生研究所が実施した令和2年度第一次補正予算 新型コロナウイルス感染症に係る体外診断薬の信頼性確保事業「COVID-19診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告（公開版）」では、フルプロセスコントロール試料を用いて30品目の検証が行われた¹⁶⁾。スピнкаラム等によるRNA抽出工程が含まれているキットでは、簡易核酸抽出工程を用いるキットに比較してLODが高かった（低濃度検体でも陽性と判定された）。当教室では独自に簡易核酸抽出によるPCR検査のLOD低下の程度を確認した。サンプルとしてAccuPlexシリーズの希釈系列を、PCR検査キットとしてSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (TaKaRa)を用いた。スピнкаラム法のQIAamp RNA viral mini kitで抽出したRNAを用いた場合のRT-qPCRのLODが約180コピー/mLだったのに対し、キットに付属するsolution Aによる簡易核酸抽出後のRT-qPCRのLODは約1,250コピー/mLであり、約7倍の差異が認められた。簡易抽出によりLODは低下するが、省力化および時間短縮がもたらすメリットは大きい。低下したLODを許容できる目的で使用される場合は簡易核酸抽出のPCRキットを選択できると考えられる。

病原体核酸検査の限界

検査前プロセス

病原体核酸検査の診断感度（陽性になるはずの症例で陽性と判定される割合）を大きく左右するのは、検査前プロセスの検体採取時期である。COVID-19を例にとると、SARS-CoV-2の潜伏期間は2～7日程度で平均4日、最大14日程度と考えられている¹⁷⁾¹⁸⁾。SARS-CoV-2による曝露を受けた場合、数日後にウイルス数がピークに達する¹⁹⁾。PCR検査は無症候者でも陽性になり、日本および海外でのクルーズ船事例の乗員乗客やニューヨークの妊婦を対象とした研究によれば、PCR陽性になった7～9割が無症状であった^{20)～22)}。また、SARS-CoV-2に曝露されてからのウイルス量増加と発症の関係性から、PCR検査は発症前から陽性となる¹⁹⁾。発症後、PCR検査は7日から10日ほどで陰性化する症例が多いが²³⁾²⁴⁾、その日数には幅があり、3ヶ月程度陽性が遷延したり、陰性化した数日後に陽性と判定されたりするケースも観察される²³⁾²⁵⁾²⁶⁾。医療施設においては、患者の治療およびフォローアップのための検査が重要であるが、PCR検査のみでは取りこぼす症例が出てくる可能性がある。そのようなケースをカバーするために、抗体検査が有用になってくると考えられ

る。COVID-19の症状出現後、7日を経過した患者においてはPCR検査と抗体検査を併用することで、精確に診断できると考えられる²⁵⁾。

検査後プロセス

感染対策上の目的で病原体核酸検査を実施する場合、結果の解釈に注意が必要である。例えばSARS-CoV-2に対するPCR検査では、検査陽性が必ずしも感染性のある状態を意味しない。既報では、感染性があることの判断基準として重要なウイルス培養検査で陽性になったのは、N1領域を標的としたPCR検査のCt値が概ね27未満の検体であったと報告されている²⁷⁾。また別の報告では、RNAが検出される期間に比較してSARS-CoV-2が培養される期間は、発症から8日以内に採取された 10^6 RNAコピー/mL以上の検体からのみであったとしている²⁸⁾。これらの報告より、発症後9日以降に採取された検体がPCR検査陽性と報告されても、その患者から感染が広がるリスクは低いと考えられる。ただし、B細胞性免疫不全宿主において約4ヶ月に渡り体内でウイルスが複製されていた症例などの例外も報告されている²⁹⁾。

おわりに

COVID-19が世界的に流行する以前、病原体核酸検査の精度管理の重要性についてはあまり議論されていなかった。COVID-19の流行によりSARS-CoV-2病原体核酸検査が急速に普及し、その精度管理が重要な課題として取り上げられている。病原体核酸検査を実施する施設、内部精度管理により検査の問題点を早期に察知して是正することに加え、外部精度管理に積極的に参加して自施設の検査レベルの確認と向上に努めることが重要である。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Wu, F, S Zhao, B Yu, et al. 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579: 265-269.
- 2) Corman, VM, O Landt, M Kaiser, et al. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25: 23-30.
- 3) Shirato, K, N Nao, H Katano, et al. 2020. Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis* 73: 304-307.
- 4) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座. BD MAXを用いた2019-nCoV検出～One step RT real-time PCRによる検査手順書～. 日本臨床微生物学会.
<http://www.jsbm.org/m-info/bdmax200428.pdf> 2021年11月19日現在.
- 5) Seo, M, R Takabatake, S Izumi, et al. 2019. Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA. *Anal Chem* 91: 12733-12740.
- 6) RICOH. 遺伝子検査用標準物質 (Reference DNA Material). RICOH.

- <https://industry.ricoh.com/healthcare/biomedical/standard-dna/infection> 2021 年 11 月 19 日現在。
- 7) Matheussen, V, VM Corman, OD Mantke, et al. 2020. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/May 2020. *Eurosurveillance* 25: 2001223.
 - 8) Görzer, I, C Buchta, P Chiba, et al. 2020. First results of a national external quality assessment scheme for the detection of SARS-CoV-2 genome sequences. *J Clin Virol* 129: 104537.
 - 9) Buchta, C, I Görzer, P Chiba, et al. 2021. Variability of cycle threshold values in an external quality assessment scheme for detection of the SARS-CoV-2 virus genome by RT-PCR. *Clin Chem Lab Med* 59: 987-994.
 - 10) Sung, H, MG Han, CK Yoo, et al. 2020. Nationwide External Quality Assessment of SARS-CoV-2 Molecular Testing, South Korea. *Emerg Infect Dis* 26: 2353-2360.
 - 11) Fischer, C, R Mögling, A Melidou, et al. 2021. Variable Sensitivity of SARS-CoV-2 Molecular Detection in European Expert Laboratories: External Quality Assessment, June and July 2020. *J Clin Microbiol* 59 (3): e02676-20.
 - 12) Asai, S, A Seki, Y Akai, et al. 2021. Nationwide external quality assessment of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification tests in Japan. *Int J Infect Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.022>
 - 13) Ishii, Y, K Aoki, M Oda, et al. 2021. A study of quality assessment in SARS-CoV-2 pathogen nucleic acid amplification tests performance; from the results of external quality assessment survey of clinical laboratories in the Tokyo Metropolitan Government external quality assessment program in 2020. *J Infect Chemother*. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.10.027>
 - 14) Alexandersen, S, A Chamings, TR Bhatta. 2020. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun* 11: 6059.
 - 15) Kim, D, JY Lee, JS Yang, et al. 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181: 914-921.e10.
 - 16) 国立医薬品食品衛生研究所. COVID-19 診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告 (公開版). 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/content/000746161.pdf> 2021 年 11 月 19 日現在.
 - 17) Guan, WJ, ZY Ni, Y Hu, et al. 2020. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382: 1708-1720.
 - 18) Lauer, SA, KH Grantz, Q Bi, et al. 2020. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med* 172: 577-582.
 - 19) Sethuraman, N, SS Jeremiah, A Ryo. 2020. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 323: 2249-2251.
 - 20) Sakurai, A, T Sasaki, S Kato, et al. 2020. Natural History of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med* 383: 885-886.
 - 21) Ing, AJ, C Cocks, JP Green. 2020. COVID-19: in the footsteps of Ernest Shackleton. *Thorax* 75: 693-694.
 - 22) Sutton, D, K Fuchs, M D'Alton, et al. 2020. Universal Screening for SARS-CoV-2 in Women Admitted for Delivery. *N Engl J Med* 382: 2163-2164.
 - 23) Fontana, LM, AH Villamagna, MK Sikka, et al. 2021. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect Control Hosp Epidemiol* 42: 659-668.
 - 24) Xiao, AT, YX Tong, S Zhang. 2020. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: A Preliminary Study From 56 COVID-19 Patients. *Clin Infect Dis* 71: 2249-2251.
 - 25) Aoki, K, K Takai, T Nagasawa, et al. 2021. Combination of a SARS-CoV-2 IgG Assay and RT-PCR for Improved COVID-19 Diagnosis. *Ann Lab Med* 41: 568-576.
 - 26) Zou, L, F Ruan, M Huang, et al. 2020. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med* 382: 1177-1179.
 - 27) Arons, MM, KM Hatfield, SC Reddy, et al. 2020. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med* 382: 2081-2090.
 - 28) Wölfel, R, VM Corman, W Guggemos, et al. 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581: 465-469.
 - 29) Baang, JH, C Smith, C Mirabelli, et al. 2021. Prolonged Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication in an Immunocompromised Patient. *J Infect Dis* 223: 23-27.
 - 30) CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. EP 17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute.
 - 31) ISO, International Organization for Standardization. 2007. ISO/IEC GUIDE 99: International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM). ISO.
 - 32) ISO, International Organization for Standardization. 2016. ISO 16577: Molecular biomarker analysis—Terms and definitions. ISO.

Quality control of a nucleic acid amplification tests for pathogens—Focusing on SARS-CoV-2—

Kotaro Aoki, Yoshikazu Ishii

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

The pneumonia pathogen of unknown cause that emerged in Wuhan, China, was whole-genome sequenced by next-generation sequencing analysis and released to the public in January 2020. The pathogen is called the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and based on the whole-genome sequence information, a nucleic acid amplification tests (NAATs) represented by reverse-transcription TaqMan real-time PCR (PCR test) was rapidly constructed. Currently, the PCR test is widely used as NAATs for pathogens related to the coronavirus disease 2019 around the world. Although a number of SARS-CoV-2 PCR tests have been developed and used, their performance is not homogeneous. Laboratory developed tests, which are constructed using arbitrary combinations of reagents, shall be validated for their performance. Among the pre-test, test, and post-test processes, many PCR tests are kits for the test process only, and even research use only reagents or in vitro diagnostics need to be validated when combined with any nucleic acid extraction method. In order to ensure the quality of testing, it is important for laboratories to detect and correct problems as early as possible through daily internal quality assesment, and to proactively participate in external quality assesment program in an effort to improve the level of testing ant their own facilities.