

東京都衛生検査所精度管理調査における新型コロナウイルス核酸検査の調査（2020年度）

河上 麻美代^a, 熊谷 遼太^a, 北村 有里恵^a, 浅倉 弘幸^a, 林 真輝^a, 永野 美由紀^a, 山崎 貴子^a, 矢尾板 優^a,
長谷川 道弥^a, 藤原 卓士^a, 三宅 啓文^a, 小田 真悠子^b, 市川 めぐみ^c, 森内 理江^b,
長島 真美^d, 鈴木 淳^a, 千葉 隆司^e, 小西 浩之^b, 貞升 健志^d, 石井 良和^f

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）検査は、reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）法をはじめとした核酸増幅検査により開始された。感染者の急増に伴い、RT-PCR 検査の需要が増大し、国は衛生検査所の施設要件緩和等の施策を実施し、検査を拡充してきた。現在、東京都においても SARS-CoV-2 検査は、多くの衛生検査所において行われている。こうした状況下に設置された衛生検査所においては、内部精度管理の実施は努力義務であり、外部精度管理調査の受検は必ずしも必要とはされていない。しかしながら、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）疑い患者を早期に診断し感染拡大を抑制するためには、検査精度の信頼性確保は重要な鍵となる。今回、東京都は、2020 年度の衛生検査所精度管理事業として、わが国で初めて SARS-CoV-2 を対象に病原体核酸検査の外部精度管理調査を実施した。配布試料は市販の SARS-CoV-2 遺伝子コントロール用いて希釈して作製した。その結果は、精度管理調査参加施設及びレファレンス施設とも概ね良好であった。COVID-19 に限らず感染症の病原体検査には高い精度確保が求められており、今後も病原体核酸検査の外部精度管理調査を継続して実施していく必要がある。

キーワード：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）、精度管理調査、病原体核酸検査、臨床検査、登録衛生検査所

はじめに

2019 年 12 月に中国武漢市を発生源とする新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、世界保健機関（WHO）により 2020 年 3 月 11 日にパンデミック宣言がなされた。当初、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検査は、保健所等の行政を介して reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）法をはじめとした核酸増幅検査により行われてきた。しかしながら、クラスターの発生等による感染者の急増に伴い、RT-PCR 検査の需要が増加した。国は SARS-CoV-2 検査実施件数を伸ばすため、RT-PCR 検査の保険適用や衛生検査所の施設要件緩和等といった様々な施策を実施してきた¹⁾。臨時的に衛生検査所の登録基準が緩和され、COVID-19 の病原体核酸検査のみを行うことに限った衛生検査所を開設できるようになった。その結果、RT-PCR 検査実施施設は増加し、2021 年 7 月現在、国内における SARS-CoV-2 の RT-PCR 検査実績は 1 日最大 20,000 件を超えている²⁾。

現在、SARS-CoV-2 の RT-PCR 検査は、地方衛生研究所、保健所、検疫所、民間検査機関、大学、および医療機関等と様々な施設において行われている。一般的に衛生検査所などの検査機関では、内部精度管理の実施と外部精度管理調査の受検が求められている³⁾が、今回臨時に設置された衛生検査所においては、内部精度管理の実施は努力義務で

あり、外部精度管理調査の受検は不要とされている⁴⁾。しかしながら、COVID-19 は感染症法の全数把握疾患でもあることから、SARS-CoV-2 感染疑いの患者を早期に診断し、感染拡大を防止するためには、検査精度の信頼性確保は重要である。

東京都では、登録衛生検査所を対象とした東京都衛生検査所精度管理調査を 2019 年度まで 39 回にわたり実施し、「東京都衛生検査所精度管理事業報告書」⁴⁾により公表している。これまで、東京都衛生検査所精度管理調査では生化学的検査や微生物学的検査等について調査を行ってきたが、遺伝子関連検査についても精度管理調査の実施が求められたことから、2019 年度は病原体核酸検査について試行的に行った⁵⁾。2020 年度の衛生検査所精度管理調査では、COVID-19 の拡大と SARS-CoV-2 に関する病原体核酸検査の精度管理の重要性を鑑み、国内における外部精度管理実施主体として初めて SARS-CoV-2 を対象に病原体核酸検査の外部精度管理を実施した。これまでの精度管理調査では、登録衛生検査所を対象としてきたが、今回の調査では、臨時の登録衛生検査所や医療機関の検査部門も対象とした。2020 年度に実施した精度管理調査の概要について報告する。

実験方法

1. 供試材料

-
- ^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
 - ^b 東京都健康安全研究センター精度管理室
 - ^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
 - ^d 東京都健康安全研究センター微生物部
 - ^e 東京都健康安全研究センター健康危機管理情報課
 - ^f 東邦大学医学部

表 1. 健康安全研究センターで所有する装置での SARS-CoV-2 の測定結果 (MB7)

方法	プライマー プローブセット	試薬・機器	測定日 (2020年)	Ct値		
				測定値1	測定値2	測定値3
① 感染研法	NIID-N2	抽出試薬: QIAamp Viral RNA mini kit (キアゲン)	7月31日	34.2	34.7	34.8
		抽出機器: QIAcube (キアゲン)	8月3日	35.6	34.9	34.1
		増幅試薬: QuantiTect Probe RT-PCR Kit (キアゲン)	8月4日	34.9	35.5	35.2
		増幅機器: QuantStudio 12K Flex (サーモフィッシャー)				
② 簡易抽出法 (タカラバイオ)	CDC N1・N2 mix	試薬: SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ)	7月31日	37.1	37.5	37.1
		機器: QuantStudio 12K Flex (サーモフィッシャー)	8月3日	37.2	37.5	37.5
			8月4日	36.9	37.2	36.7
③ 簡易抽出法 (島津製作所)	CDC N1 CDC N2	試薬: 2019新型コロナウイルス検出試薬キット (島津製作所)	7月31日	34.7/35.4	34.9/33.7	34.2/30.8
		機器: QuantStudio 12K Flex (サーモフィッシャー)	8月3日	34.7/35.1	35.0/35.2	34.9/36.0
			8月4日	35.1/33.2	34.9/35.5	35.2/35.6

AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit (Positive : 5,000 コピー/mLおよびNegative) (SeraCare Life Science) を標準品とした。RPMI 1640 Medium (Gibco) に1% Fetal Bovine Serum, qualified, One Shot™ format (Gibco) を添加した培地を用いて、標準品をそれぞれ2倍希釈し、MB6 (陰性)、MB7 (約2,500 コピー/mL) の2種類を配布用試料とした。

2. 測定方法

東京都健康安全研究センター (以下、健安研) では、国立感染症研究所 (以下、感染研) マニュアル⁶⁾に記載された方法 (以下、感染研法) と核酸精製が不要な検査試薬を用いた方法 (以下、簡易抽出法) を実施した。感染研法は、核酸抽出キットには、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、リアルタイムPCR 試薬には、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いた。プライマー、プローブはN2セットを用いた。簡易抽出法は、N領域を検出対象としたSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR kit (タカラバイオ) および2019新型コロナウイルス検出試薬キット (島津製作所) を用いた。リアルタイムPCR 機器は、QuantStudio™ 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) を用い、測定の際には、1検体につき3重測定した。なお、精度管理参加施設では、各施設で所有する機器及び機器に適合する試薬を用い、添付文書等に従い測定を実施した。

3. 精度管理調査

1) 調査対象

東京都内登録衛生検査所 12 施設、臨時の衛生検査所 4 施設、病院検査室 37 施設の計 53 施設を対象とした。また、健安研および、東邦大学医学部微生物・感染症学講座 (以下、東邦大) をレファレンス施設とした。

2) 調査方法

配布用試料を各施設に郵送し、測定結果の回答を求めた。測定は自施設の機器を用い、定性的な検査の実施を指示した。センター以外のレファレンス施設には、検体を郵送し、複数日程、同一検体を測定して日差を確認した。

結果と考察

1. 精度管理調査結果

1) リファレンス施設 (健安研) における測定結果

MB6 (陰性) の測定結果は、全て正しく陰性の結果が得られた。MB7については何れの試薬および機器のセットにおいても陽性の結果が得られた。Ct値については、タカラバイオのキットが他のキットと比較して大きい傾向が認められた (表1)。また、島津製作所のN2プライマー・プローブによる検出において日内変動が認められたが、それ以外の方法では大きな問題はなく、測定誤差は許容範囲であった。これらの結果をもとにレファレンス値を感染研のN領域 (N2セット) でCt値30~35に設定した。

2) 精度管理参加施設における測定結果

精度管理参加施設53施設のうち、リアルタイムPCR法および reverse transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法 (核酸抽出工程: キット法) を採用していた施設の結果は概ね良好であった (表2)。(なお、MB6およびMB7ともに判定不能または測定不可と回答した施設は表2中に含めていない。)

参加施設のうち全自動検査機器を使用していたのは17施設であり、MB7については1施設を除いて正しく判定されていた (表2)。この1施設が使用した測定試薬Aは、採取した検体を直接前処理チューブに入れる仕様となっており、今回配布した試料が検査試薬および機器の規定に適合していなかったことが要因の一つと考えられた。一方で、嘉瀬ら⁷⁾は、測定試薬AはSARS-CoV-2 Direction RT-qPCR Kitよりも感度が低く、測定試薬AのCt値は高く測定される傾向があると報告していることから、配布試料の濃度が測定試薬Aの検出限界値よりも低かった可能性もある。

また、参加した病院検査室37施設のうち18施設がLAMP法を採用していた。このうち核酸抽出にQIAamp Viral RNA Mini Kitを用いた5施設のLAMP法による測定結果は正しかったが、核酸抽出に簡易核酸抽出試薬であるLoopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を用いた14施設のうち、陽性の結果を正しく報告した施設は4施設であった (表2)。青木ら⁸⁾は、核酸増幅工程の違いが核酸

表 2. 測定法別の正答率

測定機器	測定法	核酸抽出工程	実施施設数	MB6(陰性)	MB7(陽性)
全自動核酸抽出装置	リアルタイムPCR法	有	11*	11 (100%)	11 (100%)
	その他	有	6	6 (100%)	5 (83.3%)
全自動核酸抽出装置以外	リアルタイムPCR法	キット法	18*	18 (100%)	18 (100%)
		簡易法	16	16 (100%)	16 (100%)
	LAMP法	キット法	5	5 (100%)	5 (100%)
		簡易法	14*	14 (100%)	4 (28.6%)
		なし	1	1 (100%)	0 (—)

* 複数の測定法を実施した施設があるため重複あり

増幅検査の検出限界に大きく影響し、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と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と報告している。今回配布した試料の濃度が簡易核酸抽出試薬を用いたLAMP法の検出限界値よりも低く、検出できなかった可能性が示唆される。一方で、簡易核酸抽出法を用いた場合のLAMP法では偽陽性が多いが、プロトコルの改良により改善が見られたと報告^{9,10)}されており、実施施設での妥当性評価が重要である。

今回のSARS-CoV-2を対象とした精度管理調査に供される精度管理試料について、大きく二つの課題が明らかになった。一点目はあらゆる種類の測定方法に対応すること、二点目は各測定試薬で検出可能な試料の濃度を設定することである。感染研が示している「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」⁶⁾には「2019-nCoV検出に利用できることが確認できている反応試薬、機器の組み合わせ」が示されており、施設ごとに使用している核酸抽出試薬、検出試薬および測定機器の組み合わせが多岐に渡る。しかしながら、これらすべてを網羅する精度管理試料の作製は非常に困難である。また、測定試薬や機器によって検出感度が異なることから、全ての検出試薬の検出限界値を考慮した試料の濃度設定も極めて難しいのが現状である。

こうした課題を抱えているが、RT-PCR検査の精度の確保を図るためにも継続的な精度管理調査の実施が重要である。また、現在もなお新規のSARS-CoV-2検査試薬が開発され続けており、各検査室で用いる試薬と機器の組み合わせがさらに多様化することが推測される。検査室において新規検査試薬を導入する際には、検査キットの性能評価を行い、妥当性を検証することがRT-PCR検査結果の精度を確保するためにも重要である。そのためにも日頃からの性能評価などの基礎的知識を有した人材を育成することは必須であり、精度確保に関わる研修に参加し、知識の習得および技能の向上が求められる。

今回の外部精度管理事業では、SARS-CoV-2を検出できるか否かの判定にとどめた。実際の検査室で扱う臨床検体は鼻咽頭拭い液や唾液など多岐に渡り、検体採取時期によ

りウイルス量も異なるため、より臨床に即した試料を用いて外部精度管理を行うことが必要である。COVID-19に限らず感染症の病原体検査には高い精度が求められていることから、今後も病原体核酸検査の外部精度管理調査を実施していくことが求められる。

ま と め

東京都衛生検査所精度管理事業において、SARS-CoV-2の病原体核酸検査の外部精度管理を実施した。参加した施設の結果は概ね良好であった。試料作製に課題はあるが、検査精度の信頼性確保のため、SARS-CoV-2を含め病原体核酸検査の外部精度管理調査を継続して実施していく必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働省医政局長：医政発 0305 第 1 号，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衛生検査所を臨時的に開設する場合の取扱いについて（通知），令和 2 年 3 月 5 日。
- 2) 厚生労働省：新型コロナウイルスについて 国内の発生状況など，
<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html>（2021 年 7 月 16 日現在．なお本 URL は変更または抹消の可能性はある）
- 3) 厚生労働省医政局長：医政発 0810 第 1 号，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（通知），平成 30 年 8 月 10 日。
- 4) 東京都福祉保健局医療政策部：令和元年度第 39 回東京都衛生検査所精度管理事業報告書。
- 5) 長島真美，河上麻美代，熊谷遼太，他：東京健安研セ年報，71, 61-64, 2020。
- 6) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 新型コロナウイルス感染症，
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>（2021 年 7 月 16 日現在．なお本 URL は変更または抹消の可能性はある）

- 7) 嘉瀬文孝, 飯田泰明, 太田智裕, 他 : 医学検査, **70**, 403-409, 2021.
- 8) 青木弘太郎, 石井良和 : モダンメディア, **67**, 43-47, 2021.
- 9) 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 : 簡易抽出法を用いた場合の LAMP 法検査における偽陽性について,
<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ict/clm/?p=417> (2021 年 7 月 16 日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 10) 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 : 改良法・試薬の評価 : 簡易抽出法を用いた場合の LAMP 法検査における偽陽性,
<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ict/clm/?p=584> (2021 年 7 月 16 日現在. なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)

**The Results of the External Quality Assessment of SARS-CoV-2 Nucleic Acid Test
for the Registered Clinical Laboratories in Tokyo (April 2020 - March 2021)**

Mamiyo KAWAKAMI^a, Ryota KUMAGAI^a, Yurie KITAMURA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Masaki HAYASHI^a, Miyuki NAGANO^a,
Takako YAMAZAKI^a, Yu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mayuko ODA^a,
Megumi ICHIKAWA^a, Rie MORIUCHI^a, Mami NAGASHIMA^a, Jun SUZUKI^a, Takashi CHIBA^a,
Hiroyuki KONISHI^a, Kenji SADAMASU^a, and Yoshikazu ISHII^b

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) test is performed by Nucleic Acid Amplification tests (NATs), such as reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) method. As the demand for SARS-CoV-2 testing increased with the rapid increase in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19), the Japanese government had implemented measures, such as easing facility requirements for clinical laboratories and expanded the NAT. Currently, NATs for SARS-CoV-2 are performed at many clinical laboratories in Tokyo. It is an obligation to try implementing internal quality control, and it is unnecessary to take an external quality control survey at clinical laboratories set up under these circumstances. However, it is important to ensure the reliability of test accuracy to diagnose suspected patients with COVID-19 at an early stage and prevent the spread of infection. In 2020, the quality control survey in pathogen nucleic acid tests of SARS-CoV-2 was performed in Tokyo. Samples were prepared by diluting a commercially available SARS-CoV-2 gene control with buffer solution. The results were good at both the quality control survey participating facilities and the reference facility. Since high accuracy is required for pathogen test of not only COVID-19 but also other infectious diseases, it is necessary to continue the external quality control surveys of pathogen nucleic acid tests.

Keywords: SARS-CoV-2, quality control survey, pathogen nucleic acid test, clinical test, clinical laboratory

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Toho University
5-21-16, Omorinishi, Oota-ku, Tokyo 143-8540, Japan