

日本遺伝子診療学会

新型コロナウイルス感染症検査委員会編

「病原体核酸増幅検査を行う際に知っておきたいこと」（一般的な注意点）

各論 1：「新型コロナウイルス検査」

各論 2：「サル痘（M 痘）その他の新興感染症について」

担当理事：宮地勇人（新渡戸文化短期大学）

委員会委員

東田修二（東京医科歯科大学）、前川真人（浜松医科大学）、中谷 中（上野総合市民病院）、仁井見英樹（富山大学）、下澤達雄（国際医療福祉大学）、副島隆浩（栄研化学株式会社）、谷本和仁（富士フイルム和光純薬株式会社）、八木慎太郎（富士レビオ株式会社）、飯田慶治（H.U. フロンティア株式会社）、大場利治（タカラバイオ株式会社）、西田美和（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）、吉本倫子（シスメックス株式会社）、曾家義博（東洋紡株式会社）、小林博幸（塩野義製薬株式会社）、丸瀬英明（株式会社島津製作所）、松下一之（委員長、千葉大学）。

作成協力者

平井那知（浜松医科大学）、松永 楓（富山大学）、池尻 誠（三重大学）、石毛崇之・今泉優理（千葉大学）、渡辺雄大（国際医療福祉大学）

初版 （7. 31. 2021）

「はじめて新型コロナウイルス検査を行う方のために」

改訂 （11. 1. 2021）

改訂2版 （1. 1. 2023）

「病原体核酸増幅検査を行う際に知っておきたいこと」

目 次

ページ

目次	2
はじめに（宮地）	7
本解説書の目的、趣旨と対象（松下）	8
新型コロナウイルス遺伝子関連検査の国内の現況（2023年1月時点）（松下）	8
新型コロナウイルスの構造とPCR検査の原理（松永）	11
病原体核酸増幅検査のQ and A	
総論：（東田、前川、副島、飯田、平井）	16
<u>最重要 A</u>	
Q1) 核酸検査（PCR、LAMP など）の感度はと聞かれたら、何と答えるのが正しいですか。また、偽陰性のリスクを減らすためには、どのようなことに留意すれば良いですか。	
Q2) 核酸検査（PCR、LAMP など）の特異度はと聞かれたら、何と答えるのが正しいですか。また、偽陽性のリスクを減らすためには、どのようなことに留意すれば良いですか。	
Q3) 喀痰、鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液などの検体による操作や結果の違いはどうか。	
Q4) 核酸検査を行う際、核酸抽出エリア、試薬調製エリア、核酸増幅と検出エリアなど、エリア分けをする必要性はありますか。また、その理由は何ですか。	
Q5) 感染性のある検体の取り扱い方やバイオセーフティの心得を知りたいです。	
<u>重要 B</u>	
Q6) クリーンベンチと安全キャビネットは、どのように使い分けをしますか。	
Q7) ウイルス汚染の除去作業の要点は何ですか。	
Q8) ウイルス汚染の除去作業に次亜塩素酸ナトリウムを使う際の注意事項は何ですか。	
<u>その他 C</u>	
Q9) 検査室の掃除に関して留意すべきことは何ですか。	
Q10) 遺伝子関連検査室の空圧管理の考え方を知りたいです。	
各論（実際の検査の現場での注意点）	
分析前プロセス：検体の前処理工程について：（中谷、仁井見、八木、谷本、松永）	
	26

最重要 A

- Q11) 検体保存液として不活化機能を持たない溶液（輸送液）を使用している場合には、検体の取り扱いにどのような注意が必要ですか。
- Q12) 検体保存液として不活化機能を持つ溶液（輸送液）を使用している場合には、検体を感染物として取り扱う必要はないと考えても良いですか。
- Q13) PCR 試薬の取り扱いにおいて、非特異増幅を予防する方法はありますか。
- Q14) PPE 着用はどの程度まで、どの作業まで必要ですか。
- Q15) 安全キャビネットとクリーンベンチの使用前準備（消毒方法）、使用中の注意（ゾーン分けや手袋を換えるタイミングなど）、使用後の注意（清掃方法）について教えてください。
- Q16) 作業中に、着衣や手袋を交換する必要はありますか。（安全キャビネット外の作業では殆ど手袋を換えない人が多い）

重要 B

- Q17) 検体保存液に入れていれば、室温で保存・輸送した検体であっても PCR 検査に利用可能ですか。
- Q18) 検体（スワブ、輸送培地懸濁液、PBS 懸濁液、生理食塩水懸濁液）の保管条件と保管方法について教えて下さい。
- Q19) 陽性コントロールを分注するピペットは、検体と同じピペットを用いて良いですか。
- Q20) 陽性コントロールは、検体と同じ安全キャビネット内で取り扱って良いですか。
- Q21) 出血を伴った検体は、どのように取り扱えば良いですか。

その他 C

- Q22) 検体分注用ピペットは、複数の検体を分注する度にアルコール綿で拭きとり作業をする必要がありますか。
- Q23) 試料の前処理に使用する容器は、滅菌したものを使用する必要はありますか。また、RNase free は必須ですか。
- Q24) 不活化剤入り輸送培地は使用可能ですか。
- Q25) 粘性のある検体と試薬を混合する際に注意すべき点を教えてください。
- Q26) チューブ等を氷冷する際に注意すべきことはありますか。
- Q27) DNA と RNA の取り扱いでそれぞれ注意しなければならない点は何ですか。
- Q28) 核酸抽出と精製の違いは何ですか。
- Q29) ピペットの使用法で注意すべきことを教えてください。
- Q30) ボルテックス・スピンドウンをする際の留意すべき点を教えてください。また、凍結乾燥品のチューブを開ける前にも、遠心が必要な理由は何ですか。
- Q31) フィルター付きチップを使う理由は何ですか。また、疎水性でなければいけませんか。
- Q32) 検体として不適切なものはどのようなものですか。

各論 分析プロセス: (リアルタイム) PCR の実施について:

(下澤、大場、西田、小林、池尻) 31

最重要 A

- Q33) RT (逆転写) の精度管理はどうしますか。

重要 B

- Q34) IC (内部コントロール) として添加された DNA を用いている検査試薬もありますが、検査上どのように考えれば良いですか。
- Q35) IC がない試薬の場合、増幅阻害を判断する方法はありますか。
- Q36) 検体から抽出キットを用いて抽出した RNA を用いる検査と、RNA 抽出を行わず検体をダイレクトに RT-PCR にかける検査とで検出率を比べた場合、どのような差が出ますか。
- Q37) LAMP 法とはどのような方法ですか。また、唾液検体だと LAMP 法で偽陽性が出やすいというのは本当ですか。なぜ偽陽性になるのですか。
- Q38) マルチプレックス PCR と一項目の PCR で感度に違いはありますか。
- Q39) 通常の PCR と専用機での PCR だと使用する検体量が異なりますが、感度に違いはありますか。

その他 C

- Q40) PCR 検査で機種によって速さが違うのは何故ですか。
- Q41) ロシユ製品にはプロセスコントロール (RNA) が含まれていますが、これはどのような意味がありますか。
- Q42) LAMP 法で反応が 30 分を超えたあたりで、陰性であるにもかかわらずわずかに増幅することがありますが、その原理はどのようなものですか。

教科書レベル

- Q43) 試薬、検体等の量が極めて微量のため操作が難しいと感じています。また、PCR チューブの開閉等、細かい操作に慣れていないため苦労します。扱い方やコツなどはありますか。
- Q44) (リアルタイム) PCR の原理がわかりません。

各論 (分析後プロセス) : (松下、吉本、曾家、丸瀬、石毛、大場) 35

最重要 A

- Q45) PCR 検査の増幅曲線の縦軸と横軸の意味は何ですか。
- Q46) Ct 値、Cp 値、Cq 値といろいろありますが、それぞれ何を示していて、何が異なるのですか。
- Q47) Ct 値に国際的な基準はありますか。
- Q48) 同じ Ct 値を採用している検査は同じ感度を有していると言えますか。また、同じ RNA 溶液であれば、使用する PCR 試薬や機器が異なっても、Ct 値は同じになりますか。
- Q49) PCR 検査の結果の判定について、例えば Ct 値 40 を超えて立ち上がりが見られた時に、再検、結果の解釈、臨床への報告の仕方についてのルールはありますか。
- Q50) 前日の検査で Ct 値 20 前後、当日検査で PCR が陰性になった時の対応はどうしたら良いですか。
- Q51) 抗原定量検査で陽性と出た検体に、念のため PCR 検査をすると陰性と出ました。どのように扱ったら良いですか。また、その出現頻度はどのくらいですか。
- Q52) PCR の Raw データを確認すると波形の乱れがある検体があります。どのような対策がありますか。
- Q53) 偽陽性となりうる要因にはどのようなものがありますか。
- Q54) 偽陰性となりうる要因にはどのようなものがありますか。
- Q55) 他の検体の結果に比べて蛍光が全体的に低いのですが、問題ないですか。あるいは逆に他の検体の結果に比べて蛍光が全体的に高いのですが、問題はないですか。

重要 B

- Q56) 同じ患者から採取された、唾液と鼻咽頭ぬぐい液ではウイルス量はどちらが多いですか。
- Q57) 陽性になった患者が 1 か月経過後も、PCR 陽性となります。どの程度まで陽性と検出されますか。
- Q58) 様々なキットを同時比較した成績はありますか。
- Q59) 測定結果の判定と臨床的背景が一致しない場合は、どのように考えれば良いですか。
- Q60) 抗原陽性、PCR 陰性の場合、どのような原因が考えられますか。また、その対応方法や出現頻度について教えて下さい。

その他 C

- Q61) cobas6800 では、操作画面に増幅曲線が表示されませんが、偽陽性に気がつくにはどうしたら良いですか。また、閾値の設定は PCR 装置の自動モードを利用しても良いですか。
- Q62) 使用する製品によって、持ち込み患者検体量が異なるにもかかわらず、PCR 反応の部分の感度のみを比較することに意味はありますか。
- Q63) PCR 後の廃棄物を捨てる際に注意すべき点は何ですか。
- Q64) Ct 値と症状の有無や重症度に相関がありますか。
- Q65) 試薬ごと、施設ごとの Ct 値をどのように比較すれば良いですか。

各論 1：「新型コロナウイルス検査」 45

最重要 A

- q 1) 検体種や検体前処理等が違うのに、Ct 値で比較評価して良いのですか。Ct 値 40 は判定基準となるのですか。
- q 2) N1 だけまたは N2 だけ立ち上がった時の解釈はどうしたら良いですか。

重要 B

- q 3) PCR 検査と抗原検査をどのように使い分けていますか。
- q 4) 変異株を同定検出する意義は何ですか。また、NGS 全ゲノム解析が必要ですか。
- q 5) 変異株が PCR 検査の感度や特異度に与える影響はどのようなものがありますか。
- q 6) Ct 値 > 40 の低コピーのウイルスでは、他人へ感染させる可能性は低いですか。

その他 C

- q 7) 時間外の新型コロナウイルス検査をどのようにしていますか。
- q 8) COVID-19 のスクリーニングとしての無症状者への SARS-CoV-2 核酸検査はどのように考えれば良いでしょうか。

教科書レベル

- q 9) PCR は DNA を増やす技術と聞いています。新型コロナウイルスは RNA ウイルスのはずですが、何故 PCR で測定ができるのですか。

関連するトピックス 54

1. 変異株の NGS による検査 (石毛)
2. 検査部・検査室の現場スタッフ (初心者) へのトレーニングの実際

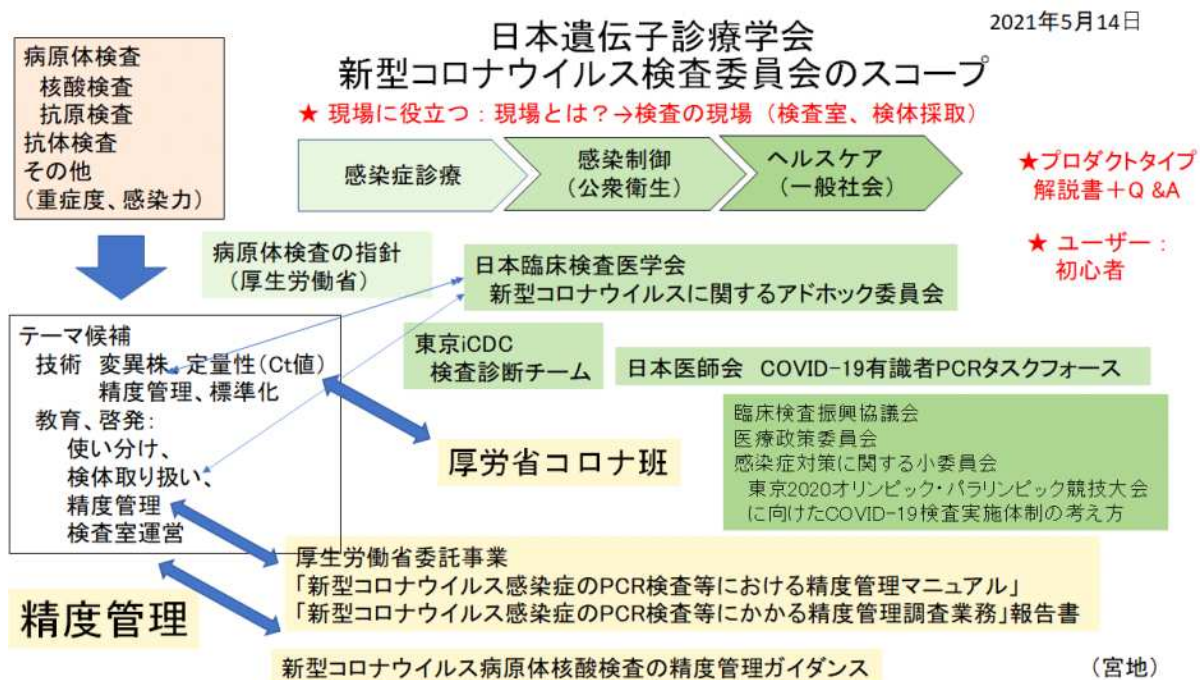
(平井、松永、池尻、石毛)

3. 不顕性感染者の下水による検査 (小林)
4. 抗原定量検査と PCR 検査の比較 (八木)
5. 国内の新型コロナウイルス抗原検査 (抗原定性検査、抗原定量検査) の役割の変化 (八木)
6. 核酸検査の精度管理、精度管理物質、コンタミネーション防止 (大場・松下)
7. 変異株解析の使い分け (今泉・石毛)
8. 内部精度管理 (Internal Quality Control; IQC) と外部精度評価 (External Quality Assessment; EQA) (前川)
9. 2 類と 5 類 (第 8 波への対応)
10. ポストコロナへの応用 (SARS-CoV-2のPCR検査の経験をゲノム医療分野に発展させるには) (松下)
11. サル痘などの新興感染症への対応
12. 海外の状況 (WHOなど、ウイズコロナの時代)
13. 各企業へのユーザーからの質問を整理する (吉本)
14. IVDとLDTs (松下)
15. 核酸増幅法の呼称について (松下)

各論 2: 「サル痘 (M 痘) その他の新興感染症について」	79
参考資料 1 (解析法)	80
参考資料 2 (遺伝子関連検査・染色体検査の精度確保にかかる留意事項について)	89
参考資料 3 (SARS-CoV-2 における RT-PCR-CE の原理と判定について)	90
参考資料 4 (新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令等の一部改正について)	93
参考文献	95
おわりに	97

はじめに

2021年度第1回の委員会（2021年5月14日WEB開催）において、本委員会の活動目標として、新型コロナウイルス感染症検査に従事する初心者向けの解説書とQ&Aの作成を行うこととなり、「はじめて新型コロナウイルス検査を行う方のために」を2021年7月に初版として発行しました。本解説書は、日本遺伝子診療学会のホームページにて無料公開され、多くの方々に活用頂いてきました。2022年度第1回の委員会（2022年10月13日WEB開催）において、解説書の利用状況について確認がなされるとともに、取り巻く環境変化を踏まえて、解説書第2版「病原体核酸増幅検査を行う際に知っておきたいこと」として改訂作業を進めることとなりました。検査の従事者において、検査実施を継続する中で、精度管理や変異株への対応など実践的課題に関する知識の必要性が高まっています。解説書第2版では、それらのポイントについて、Q&A、トピックスの項目として追加しました。また、一般的事項と新型コロナウイルス感染症に特化した事項など全体構成を整理するなど編集作業が進められ、発行の運びとなりました。本解説書が広く活用されることで、正しい理解のもと核酸増幅検査が適切に実施され、また信頼性ある測定と結果の報告が継続されることが望まれます。



本解説書の目的、趣旨と対象

1. 日本遺伝子診療学会の委員会として主に核酸増幅検査（PCR 検査と LAMP 法）を対象としました。
2. アカデミアや企業の担当者から、現場の臨床検査技師や医師が疑問に感じていること（Question: Q）を関係者にアンケートしました。業務上の重要性から最重要 A、重要 B、その他 C の3段階に分類しました。
3. 上記アンケートをもとに、新型コロナウイルス検査に関して、総論、分析前、分析、分析後プロセスの4段階の（Q）を分類しました。各グループは4名の委員会委員と病院検査部の遺伝子関連検査を専門とする大学病院検査部の臨床検査技師を加えた5名で構成されます。
4. 本委員会は新型コロナウイルス検査に関することを対象としますが、NGS 解析を含む遺伝子関連検査全体の発展を目的とします。

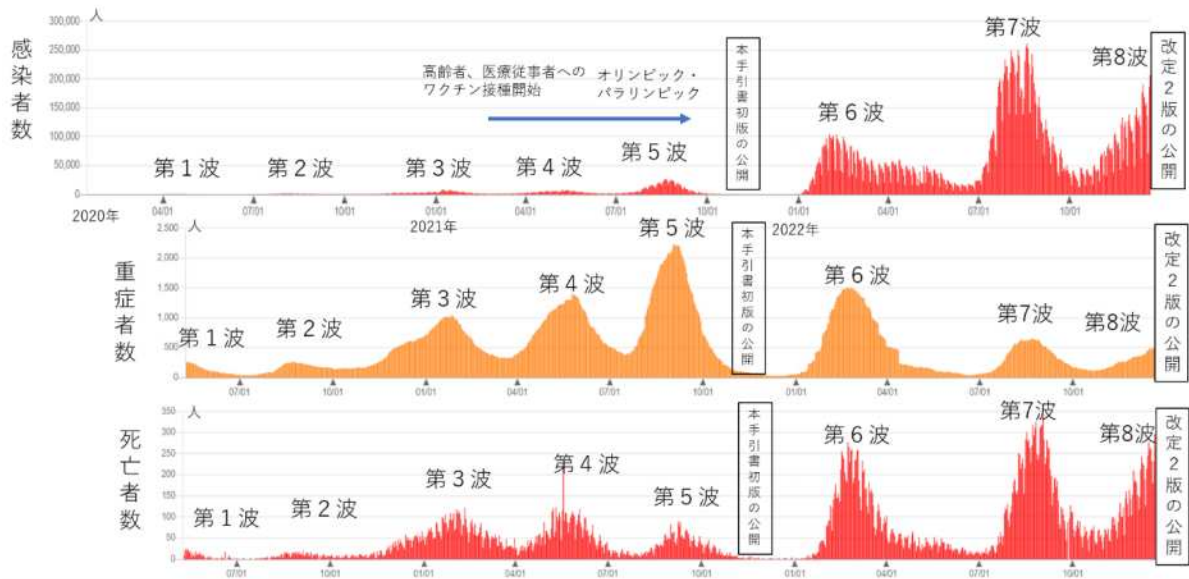
改訂2版の経緯、2022年12月までの状況について。

新型コロナウイルス遺伝子関連検査の国内の現況（2023年1月時点）

わが国では、2020年2月頃の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の流行のはじめではPCR検査は行政検査で行われていました。当時各施設は行政検査として行われていたSARS-CoV-2遺伝子検査を病院や登録衛生検査所における臨床検査として行うために、国立感染症研究所、地方自治体や地域の保健所との連携体制を構築することから行いました。

すなわちSARS-CoV-2のPCR検査は行政検査で行われており、臨床検査としての検査法が確立しておらず、分析的妥当性が担保された検査室での検査（LDTs）として行われていました。加えて、病院検査室では、核酸検査の経験がほとんどないスタッフも多いことがありました。このような状況の中で、少しでも現場スタッフに役立つように、日本遺伝子診療学会の新型コロナウイルス感染症検査委員会では、2021年11月頃に「**はじめて新型コロナウイルス検査を行う方のために**」を学会ホームページで公開しました。お陰様で多くの検査現場で読まれて、少しは診療の一助になったのではないかと考えております。

データからわかる - 新型コロナウイルス感染症情報 (厚生労働省ホームページより) - (mhlw.go.jp)
https://covid19.mhlw.go.jp/extensions/public/index.html

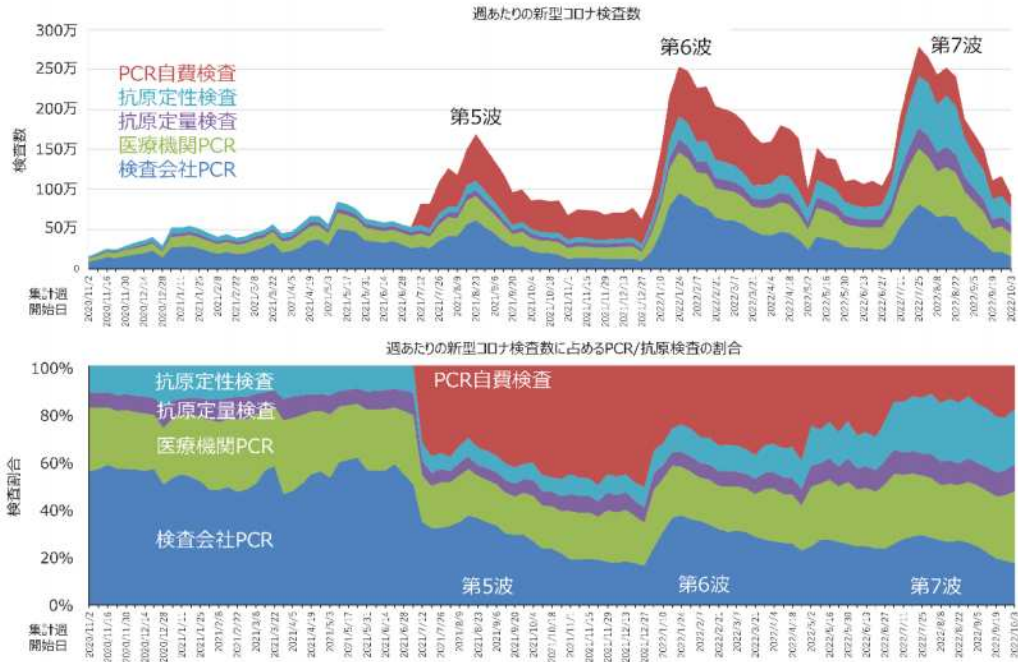


2022年12月現在、オミクロン株が主体となった第6波、第7波を経験して第8波といわれる状況となり、SARS-CoV-2 核酸検査は国内の多くの検査室で行われるようになりました。各病院検査室では行政検査の委託を受けるために、保健所や地方自治体の衛生研究所と協働して検査体制を構築しました。約2年半の間に多くのIVD (in vitro diagnostics) が開発されて SARS-CoV-2 核酸検査が保険収載されるようになると、内部精度管理 (IQC) や第三者機関による外部精度管理調査 (EQA) を行う必要が生じました。課題としては核酸検査の IQC や EQA の具体的な方法の確立、標準化があります。本解説書が2021年11月に公開されて以降、約1年間の病院臨床検査室や関連する企業等における SARS-CoV-2 の核酸検査の国内の現状を踏まえて、その経験を今後の核酸検査 (ゲノム医療) に発展させるための課題についても関連する情報を追記しました。ご一読いただけますと幸いです。

2023年1月23日、厚生労働省は新型コロナウイルス感染症を感染症法上の位置づけを「5類」に引き下げるために必要な措置などの具体的な議論を開始することになりました。「5類」になれば限られた医療機関で行われていた検査も、さらに多くの医療機関で行われるようになると推測されます。今回の改訂版が「はじめて新型コロナウイルス検査」を行う多くの医療関係者の参考になることを願っています。

(2023年1月)

(松下)

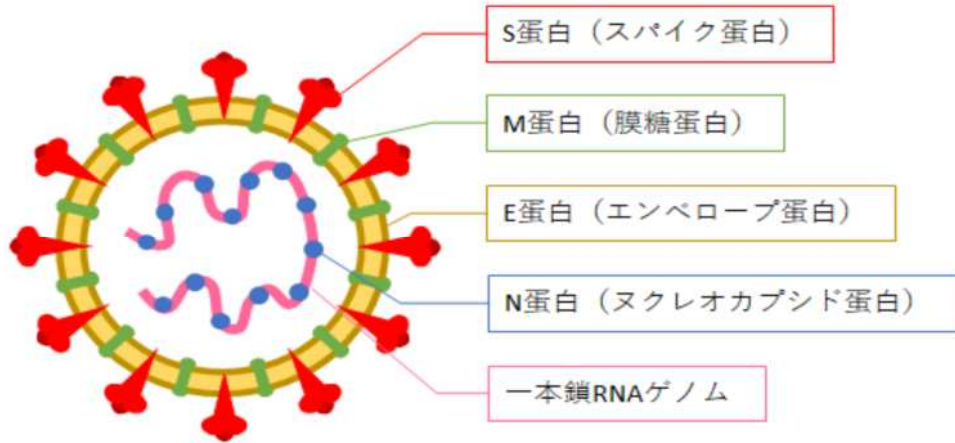


(PCR 検査数は厚生労働省より公表されている (<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/open-data.html>) PCR 検査の実施件数を独自に集計した (最終ダウンロード日は2022/10/21)。抗原検査数は厚生労働省より公表されている (<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html>) 「検査に関する参考資料、国内における新型コロナウイルスに係る抗原検査 (検体採取) の実施状況 (検体採取日ベース)」を独自に集計した (令和4年10月12日集計データまでを用いた)。いずれも公表時のデータを用いているため、公表後加えられた訂正情報が反映されていない場合があることに注意されたい。)

第7波においては、各種検査数が増大している中で、医療機関における院内PCRおよび抗原定性検査の比率が大きくなっていった。(八木)

新型コロナウイルスの構造と PCR 検査の原理 (松永)

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の構造



SARS-CoV-2 RNAゲノム (イメージ図)

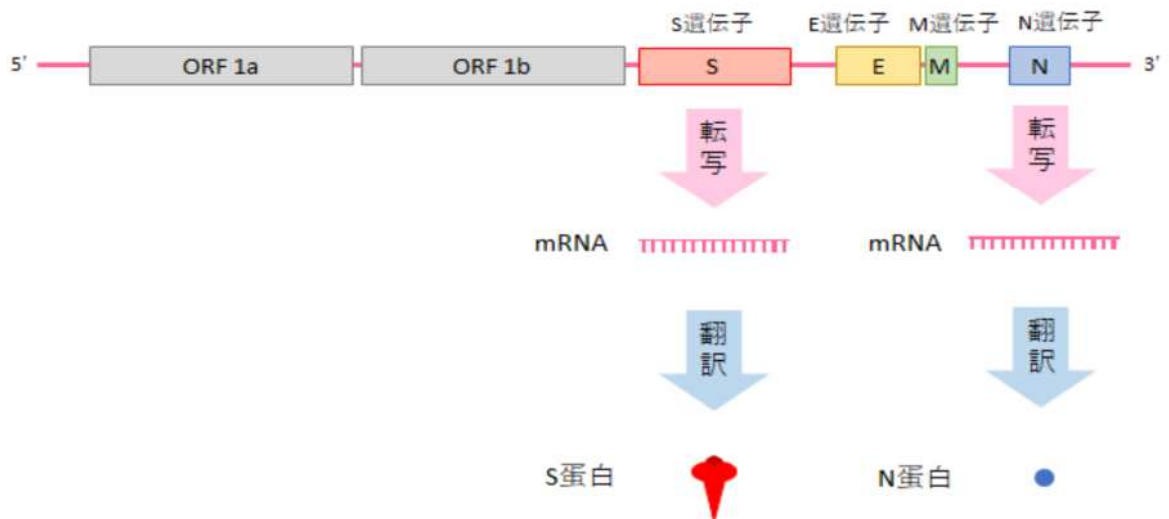


図 1 : 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の構造と RNA ゲノム

SARS-CoV-2核酸増幅検査の流れ（イメージ図）

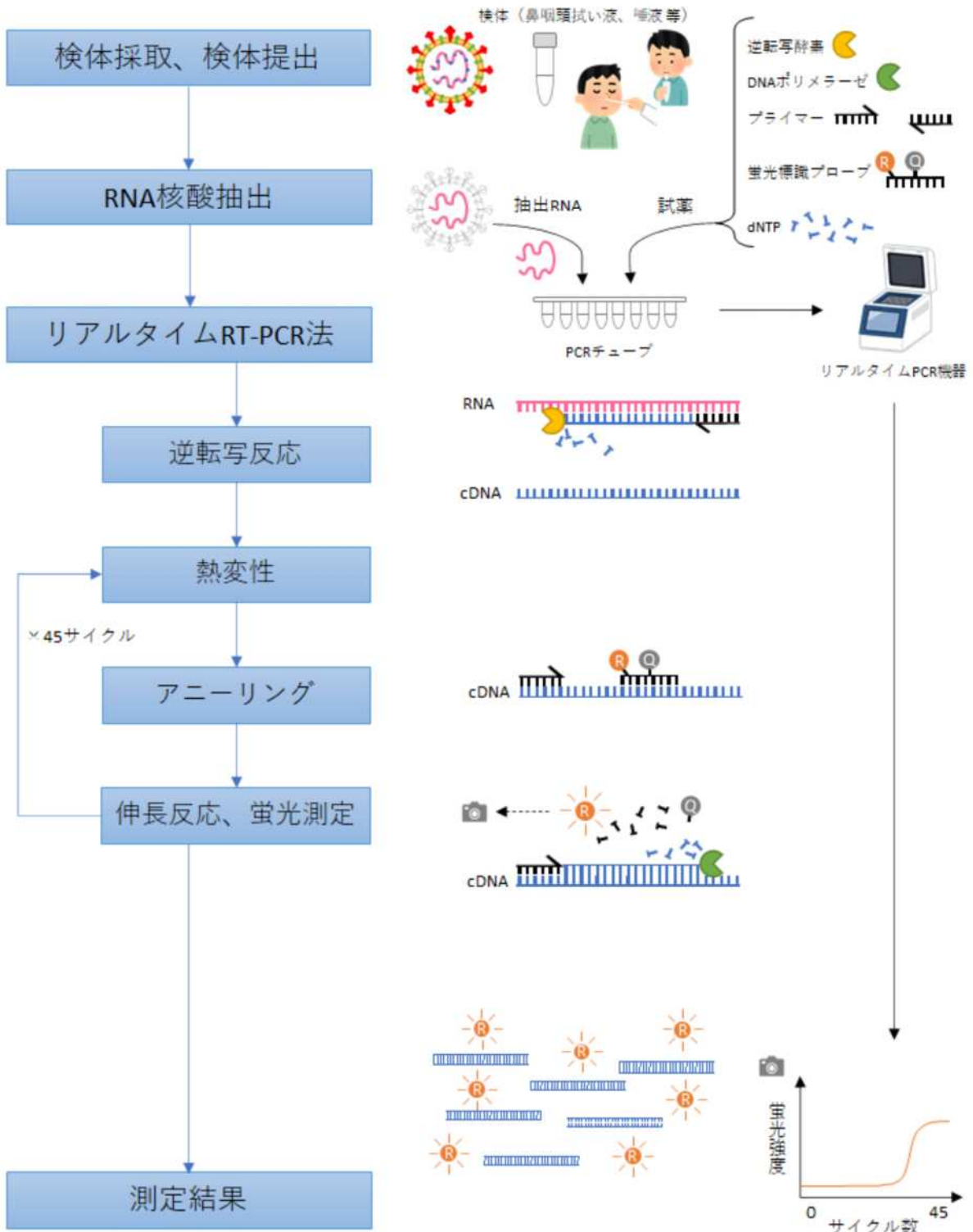


図2：SARS-CoV-2核酸増幅の流れ（イメージ）。検体採取、RNA抽出、RT-PCR、測定結果の解釈のステップに分かれる。

SARS-CoV-2におけるリアルタイムRT-PCRの原理と判定について

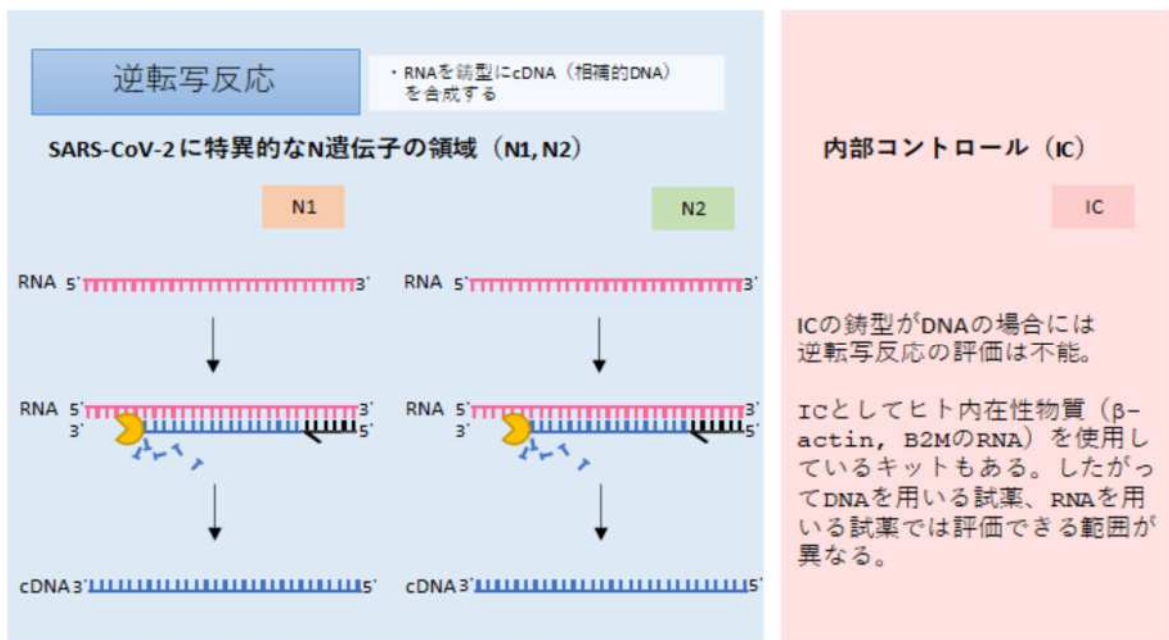
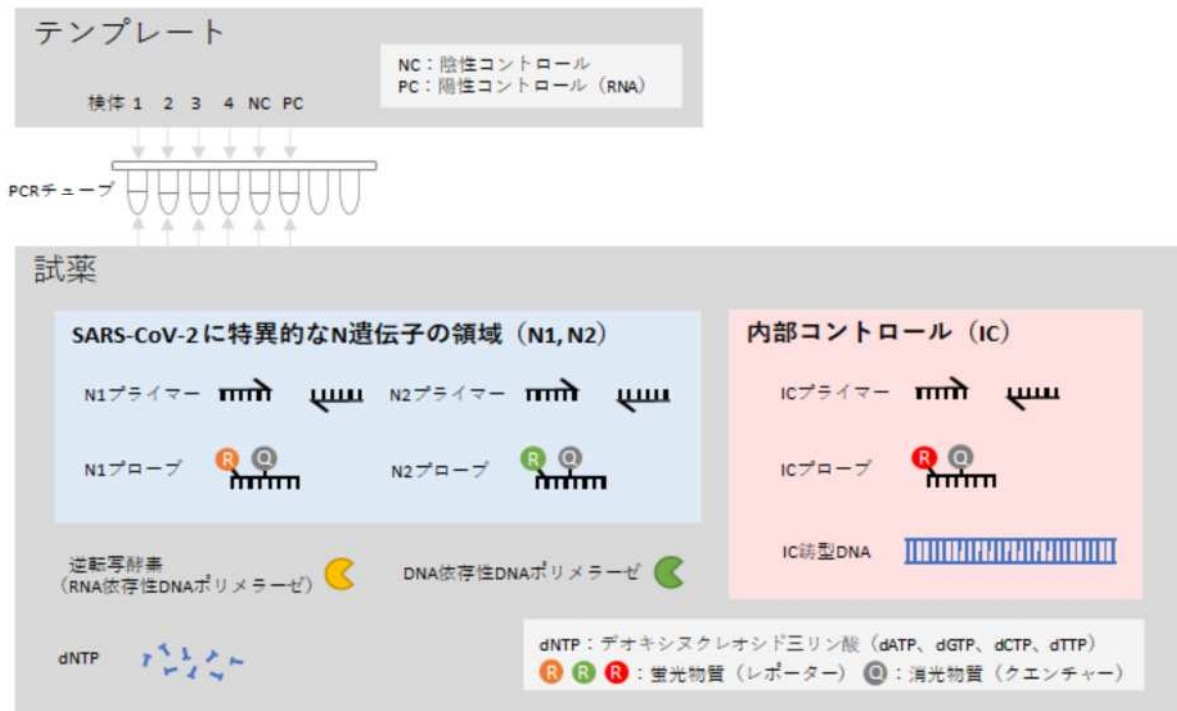


図3 : SARS-CoV-2 のリアルタイム RT-PCR の原理と判定について 1
逆転写反応の過程を示す。ヒト内在性物質として DNA を用いる試薬と RNA を用いる試薬がある。両者では、逆転写反応の最初のステップを評価できる範囲が異なるため注意が必要である。

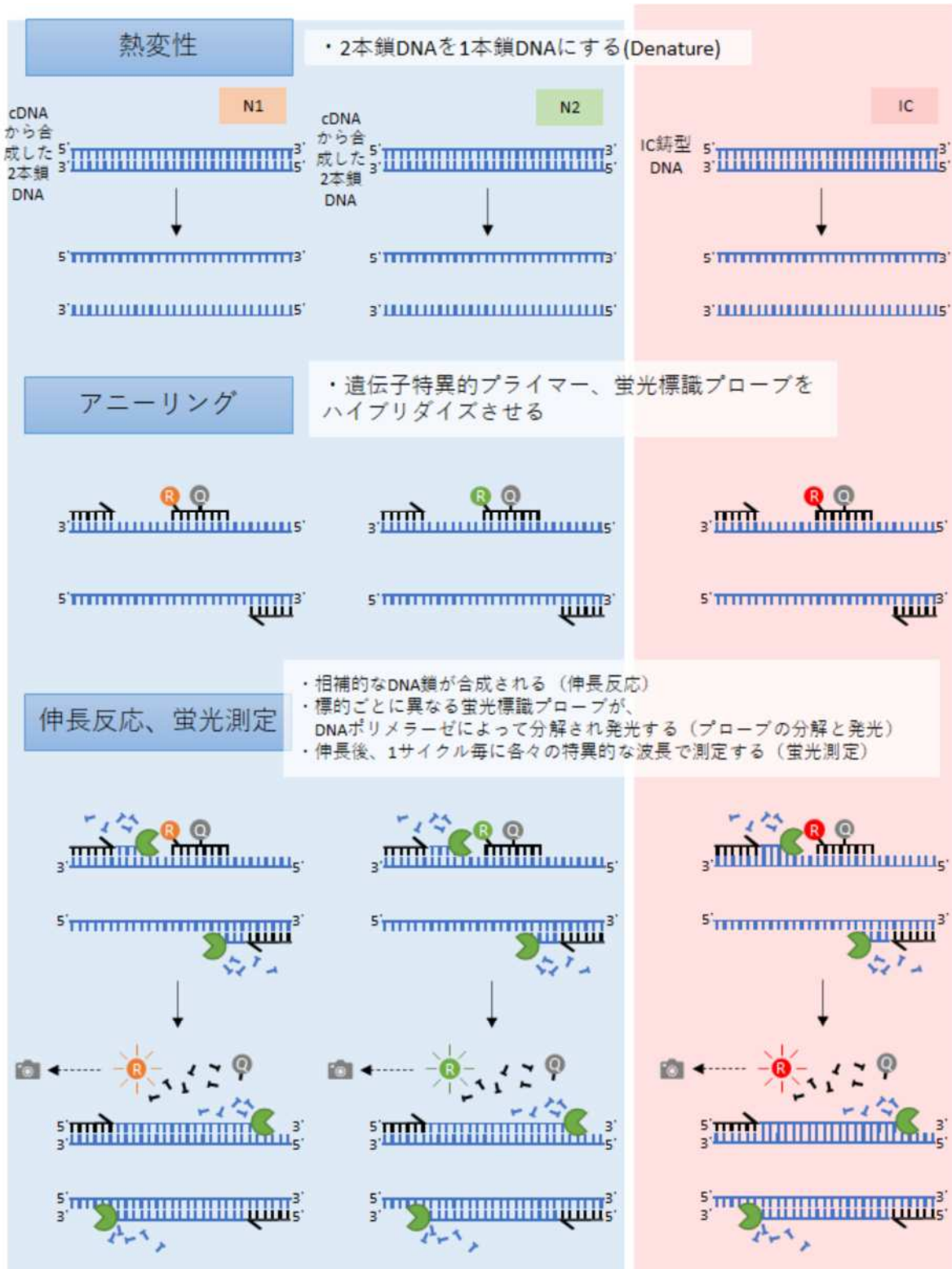


図4 : SARS-CoV-2 のリアルタイム RT-PCR の原理と判定について 二重鎖 DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、伸長反応、蛍光測定の過程を示す。

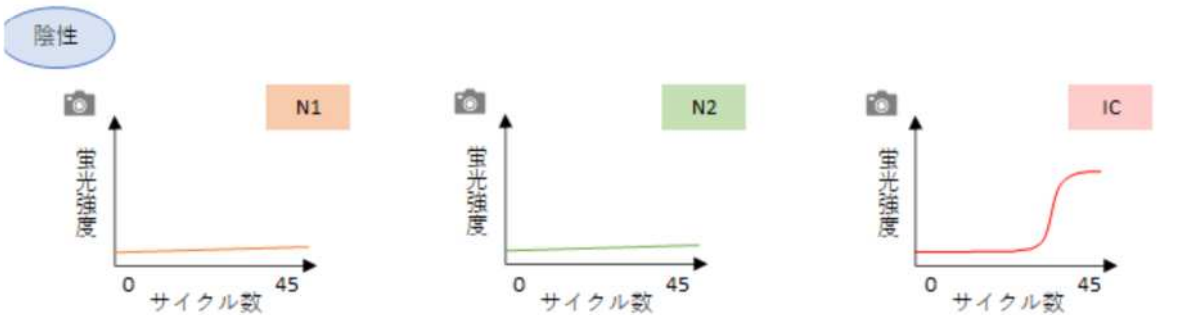
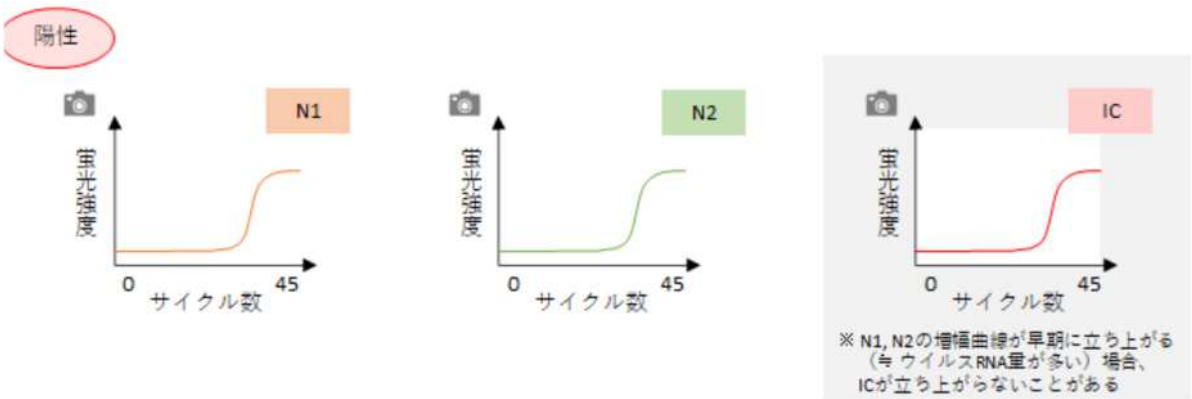
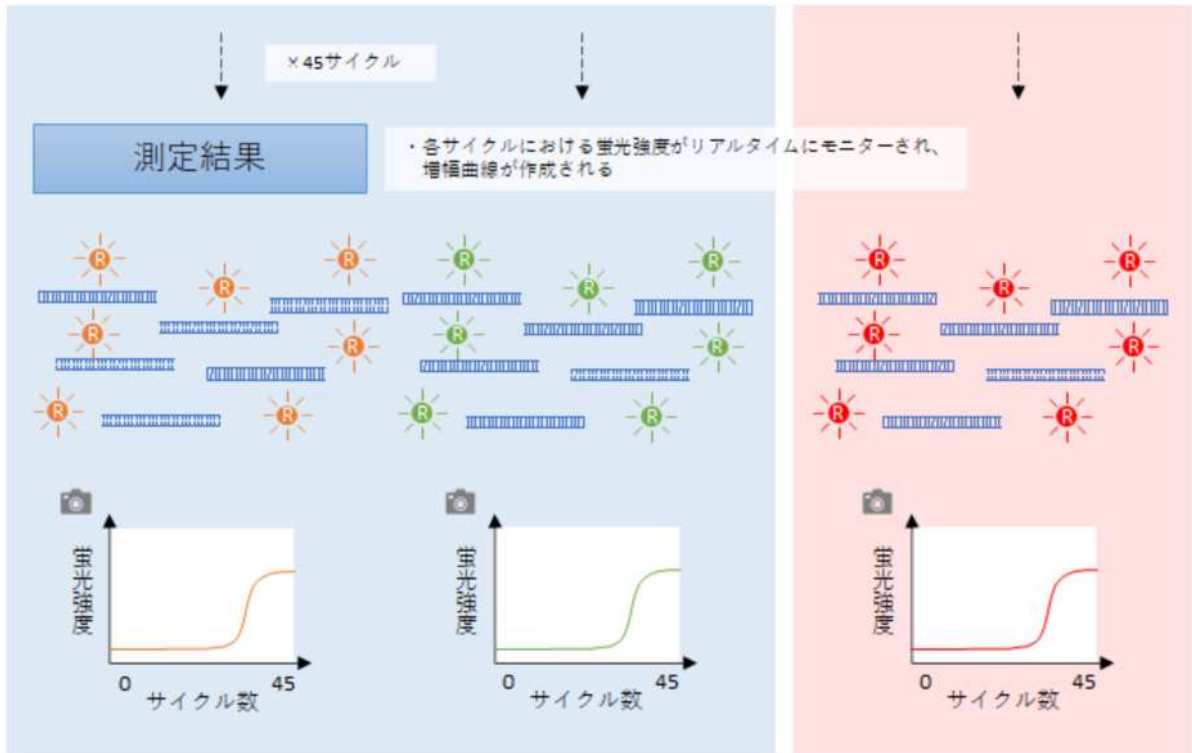


図5：SARS-CoV-2のリアルタイムRT-PCRの原理と判定について3
測定結果の解釈。N1、N2のシグモイドカーブ、Ct値、ICの反応性などを総合的に解釈する。必要であれば判定保留として再検査を検討する。

病原体核酸増幅検査の Q and A

総論：東田、前川、副島、飯田、平井

最重要 A

Q1) 核酸検査（PCR、LAMP など）の感度はと聞かれたら、何と答えるのが正しいですか。また、偽陰性のリスクを減らすためには、どのようなことに留意すれば良いですか。

A1) 感度には分析感度と診断感度があるので、分けて理解する必要があります。ISO 15189 の 5.5.1.3 の Notes にも分析感度と診断感度が記載されています。

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定義されます¹⁾。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ます。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 が併記されています。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言える最小量（値）を指します。したがって、SARS-CoV-2 の分析感度はコピー/μL で示すべきです。PCR で用いられる Ct 値は相対的なものであるためコピー数の代用として使用すべきではありません²⁾。また、例えばメーカーが独自のキャリブレーションを使っている場合、PCR 製品 A キットの 1 コピー/μL は別の PCR 製品 B キットの 1 コピー/μL と等しくなるとは限りません。A キットと B キットの比較をする場合は、コピー数既知の参照物質から値付けする必要があります。

なお、LAMP 法で得られる結果は、あくまでも陽性、陰性の定性であり、得られた結果（Tt 値：Threshold time 値）からコピー数を算出することはできません。一方、診断感度は、一般的に感度と特異度、ROC カーブとセットになって議論される感度を示しており³⁾、この設問でも「偽陰性のリスクを減らすためには」と続くことから、診断感度を上げているものと考えられます。すなわち、病気がある群での検査の陽性率（真陽性率）を感度、病気がない群での検査の陰性率（真陰性率）を特異度と呼ぶ場合の、その感度のことです。当初、COVID-19 診断目的での PCR の感度は約 70%と言われていましたが、当然ながら検体採取の時期、発症との関係で陽性率は変化するため、一概には言えません。また、PCR 検査の各プロセスが適切に行われたか、測定法や測定試薬・機器によっても陽性率は変わります。偽陰性のリスクを減らすためには、つまり陽性率を上げるためには以下の要因に留意して、適切なタイミングで適切に検査を行うことが重要です。

➤ 分析前プロセス

- 検体の採取：鼻咽頭スワブの感度が全般的に高く適切な方法で検体を採取する必要があります。
- 検体採取のタイミング：発症前 1 日から発症後 3 日の偽陰性率が低い（感度が高い）とされています。

- 検体の取り扱い：標的となる RNA が分解しないよう、適切な取り扱い、保管方法で対応します。基本的には可及的速やかに検査に供しますが、必要に応じて、ウイルス不活化剤や RNA 安定化剤を使用します。また、保管や輸送する場合は、保証された方法で行うことが必要です。

➤ 分析プロセス

- 分析法の種類：PCR 検査試薬はたくさんあるため、妥当性を確認し分析感度の高いものを選びます。流行している変異株でも検出できることを確認しておきます。
- 分析法の質管理：内部標準の増幅を確認し、PCR の阻害が生じていないことを確認します。適度に内部精度管理用試料を測定して適正に測定されていることを確認します。可能な限り信頼性のある技能試験に参加して測定法の妥当性を確認します。

➤ 分析後プロセス

- 分析結果の解釈と報告を間違えないようにします。
- 臨床所見など、他の患者情報と矛盾がないかどうか、臨床側との情報交換を欠かさないことが重要です。場合によっては再測定もしくは再検査を行います。

参考資料

- 1) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)、遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス. 日本臨床検査標準協議会, 2021, p58.
- 2) 東田修二. 新型コロナウイルス検査の感度・特異度と結果報告の標準化. 日本臨床検査医学会誌 2021 ; 69: 405-409.
- 3) 三宅一徳. 臨床検査の偽陽性と偽陰性について (日本臨床検査医学会編. 一般の方、非医療者の方へ) .
<<https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200427.pdf>>, (2021.10.31 最終参照日).

(前川、副島)

Q2) 核酸検査 (PCR、LAMP など) の特異度はと聞かれたら、何と答えるのが正しいですか。また、偽陽性のリスクを減らすためには、どのようなことに留意すれば良いですか。

A2) 感度と同様に特異度にも分析特異度と診断特異度があります。分析特異度 (分析特異性) では干渉物質と交差反応を確認する必要があります¹⁾。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 (様々な潜在的な薬物の干渉を含む) などが含まれます。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叉干渉を及ぼすかどうかを考慮します。基本的には測定試薬の添付文書に記載されて

います。一方、診断特異度は病気がない群での検査の陰性率（真陰性率）を特異度と呼びます^{2) 3)}。

偽陽性のリスクを減らす、すなわち特異度を上げることであり、有病率が低い集団で検査する場合の陰性的中率（陰性予測値）を上げるために極めて重要です。

偽陽性のリスクを減らすためには、特に以下の要因に留意して適切に検査を行います。偽陰性と異なり、分析プロセスにおける要因が大部分を占めます。

➤ 分析前・分析プロセス

- 分析法の種類：PCR 検査試薬は多数あるため、妥当性を確認し分析特異性の高いものを選びます。流行している変異株でも異常反応が生じないことを確認しておきます。
- 分析法の質管理：内部標準の増幅が適正に行われていることを確認し、PCR の異常反応が生じていないことを確認します。適度に内部精度管理用試料を測定して、適正に測定されていることを確認します。可能な限り、信頼性のある技能試験に参加して測定法の妥当性を確認します。
- 検体の取り違い（全プロセスで）に留意します。
- 陽性試料のコンタミネーションに留意し、水などの陰性対照を同じバッチで測定することが重要です。
- PCR 産物の入った容器を開けないようにします（キャリーオーバーコンタミネーションのハイリスク）。
- 環境中のウイルスの破片の試料への混入に留意します。
- 一度感染したヒトの体内に残存した不活化ウイルス断片を検出している可能性があることに留意します。
- PCR の増幅曲線を視認できる場合は、非特異増幅（通常は Ct 値が大きい）に留意して増幅曲線を確認することが大切です。

➤ 分析後プロセス

- 分析結果の解釈と報告を間違えないよう確認します。
- 臨床所見など、他の患者情報と矛盾がないかどうか、臨床側との情報交換を欠かさず、場合によっては、再測定もしくは再検査を行い確認します。

なお、LAMP 法での非特異反応に対しては、以下のことに留意してください。

- 試薬の添付文書に従った手順で行います。
氷上での検体や試薬の分注時に、十分に温度が下がっていない、もしくは室温での操作が想定より長い場合、非特異反応が出現する可能性があります。
- 非特異反応を低減する前処理を行います。
唾液検体を用いる場合、前処理（①PBS 希釈遠心、②スプタザイムまたはプレソルブ処理）を実施することで、非特異反応の影響が低減されます（栄研化学社内データ）。
①の場合、唾液 500 μ L に対して等量の PBS(-)を添加懸濁し、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10

分間遠心後の上清 200 μ L、②の場合、唾液 200 μ L に対してスプタザイムまたはプレソルブ 200 μ L を添加懸濁し、室温で 5 分放置後の唾液 200 μ L、それぞれを Loopamp ウイルス RNA 抽出試薬に添加して RNA を抽出します。

参考資料

- 1) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)、遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス. 日本臨床検査標準協議会, 2021, p58.
- 2) 三宅一徳. 臨床検査の偽陽性と偽陰性について (日本臨床検査医学会).
<<https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200427.pdf>>, (2021.10.31 最終参照日).
- 3) 東田修二. 新型コロナウイルス検査の感度・特異度と結果報告の標準化. 日本臨床検査医学会誌 2021 ; 69: 405-409.

(前川、副島)

**Q3) 喀痰、鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液などの検体による操作や結果の違いは
どうですか。**

A3) PCR 検査を対象として説明します。

検体としては下気道に本ウイルス量が多いことが報告されていることから、できる限り喀痰などの下気道由来検体を用いますが、採取が難しい場合は鼻咽頭ぬぐい液を用います¹⁾。鼻腔ぬぐい液や唾液を用いても検出できますが、鼻咽頭ぬぐい液よりも感度が低いことが報告されています。

【喀痰検体の操作】

前処理方法にはジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) 溶解法または PBS(-)懸濁法があります。

➤ DTT 溶解法

喀痰に対して 1 容量の 10%DTT (DNase 処理済、用事調整、PBS(-)希釈) を添加し懸濁、室温で 15 分間インキュベート、次に DNase で処理した試料を RNA 精製に用いる被検検体とします。本法は、喀痰内部に閉じ込められたウイルスも浮遊させるため、ウイルス RNA 抽出の高効率化が期待できます。しかし、喀痰に含まれるゲノムなどの夾雑物も同時に溶出されることになるため、DNase 処理や溶解液の希釈などの処理を行うなどして、ウイルス RNA の抽出効率に影響しないようにすることが重要です¹⁾。

➤ PBS(-)懸濁法

喀痰に対し 1~3 容量の PBS(-)を添加し懸濁します。次に 20,000 \times g、30 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心後の懸濁液上清を RNA 精製に用いる被検検体とします。本法は、喀痰表面に存在する

ウイルスを浮遊させることは可能ですが、喀痰内部に閉じ込められたウイルスまでは効率よく浮遊させることができないと考えられます。さらに PBS(-)等の懸濁液を多く添加することによって喀痰そのものが希釈されてしまうため浮遊ウイルス濃度が薄くなり、ウイルス RNA の抽出効率が低くなる可能性があります。

【唾液検体の操作】

滅菌容器（10～50mL 遠沈管等）に 1～2mL 程度の唾液を自己採取してもらいます（5～10 分間かけると 1～2mL 採取できます）。唾液は粘性が高いため検体取扱時のピペット操作が困難なことがあるため、検査にあたっては、唾液に対して容量で 1～3 倍量（唾液により粘性が異なるので、適宜、容量を変更）の PBS(-)を添加し、ボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁し、遠心後、上清を用いて核酸抽出を行います²⁾。

【鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液の操作】

鼻咽頭ぬぐい液を採取する場合は滅菌綿棒を鼻孔から挿入し、上咽頭を十分にぬぐいます（自己採取不可）。

鼻腔（前鼻孔）ぬぐい液を自己採取する場合は医師等の監視の下で採取します。綿棒を前鼻孔に 2～3cm 程度挿入し、5～10 秒ほどかけて鼻粘膜に沿って綿棒を 5 回転させ、5 秒程度静置し湿らせます。

それぞれのぬぐい液はウイルス輸送液（UTM、VTM）、PBS、生理食塩水のいずれかが 1～3 mL 添加された容器に検体採取後の滅菌綿棒（フロックスワブやレーヨンやポリエステル³⁾の材質を含む）が投入された状態であり、容器内の検体浮遊液をそのまま RNA 精製に用いる被検検体とします。

【核酸増幅検査に用いる検体の輸送までの保管方法】

検体採取後、可能な限り速やかに冷蔵（4℃）に保管し、輸送開始までに 48 時間以上かかる場合は凍結保存（可能であれば-80℃以下）します。

【結果の違い】

厚生労働省は鼻咽頭ぬぐい液を感染研法で測定した値と唾液を感染研法、ダイレクト PCR 法、LAMP 法で測定した値の一致率を検証した結果、感染研法 84.1%（74/88）、ダイレクト PCR 法（3 種類の試薬キットの結果）①78.4%（69/88）、②81.8%（72/88）、③68.2%（60/88）、LAMP 法 72.7%（64/88）と報告しています³⁾。鼻腔ぬぐい液については感染研法を用いて鼻咽頭ぬぐい液との比較を行ったところ、陽性一致率は 80.0%（24/30）、陰性一致率は 100%（5/5）と報告しています⁴⁾。つまり、鼻咽頭ぬぐい液を用いた PCR の検査で陽性、鼻腔ぬぐい液や唾液では陰性と判定されることがあり得ます。ただし、個々の症例によっては鼻腔ぬぐい液や唾液で陽性、鼻咽頭ぬぐい液で陰性ということも起こり得るので判定には注意が必要です。

参考資料

- 1) 国立感染症研究所. 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. 2021/03/19 更新版.
- 2) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 令和2年3月19日.
- 3) 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, 2020年6月30日.
- 4) 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) およびインフルエンザの診断における鼻咽頭拭い液・鼻かみ鼻汁液・唾液検体を用いた迅速抗原検査の有用性の検証のための研究班 研究代表者 倭正也: 鼻腔拭い液検体を用いた新型コロナウイルス検査の有用性に関する中間報告 2020年9月15日.

(飯田)

Q4) 核酸検査を行う際、核酸抽出エリア、試薬調製エリア、核酸増幅と検出エリアなど、エリア分けをする必要性はありますか。また、その理由は何ですか。

A4) 各作業におけるコンタミネーションを回避・防止するために、エリア分けをする必要があります。理由は、コンタミネーションを起こすことで検査室が汚染され、検査結果の誤判定につながるからです。また、そのエリアの清掃・除去には多大なる労力が必要となり、しばらく検査を中止しなければならないことを避けるためにも必要です¹⁾。

- なお、コンタミネーションには、取り扱う試料や DNA の汚染 (クロスコンタミネーション) と増幅産物の汚染 (キャリーオーバーコンタミネーション) があります²⁾。
- クロスコンタミネーションの原因は、前処理から核酸分注工程での陽性検体や陽性コントロールからの陰性検体および陰性コントロールへの汚染、使用試薬、使用器具 (ピペット、チューブ) の汚染と様々です。
- キャリーオーバーコンタミネーションの原因は、増幅産物のエアロゾルによる汚染です。

参考資料

- 1) 横田浩充. 遺伝子検査室の立ち上げ. Medical Technology 2012 ; 40 : 1564-1570.
- 2) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS), 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス. 日本臨床検査標準協議会, 2021. P69.

(副島)

Q5) 感染性のある検体の取り扱い方やバイオセーフティの心得を知りたいです。

A5) バイオセーフティとは危害 (生物災害) 対策を示し、検査室においては従事者の感染防止対策および環境汚染防止対策を目的として、病原体等による曝露や漏洩を予防するためのリスクマネジメントを行うことです。つまり、病原体等を自分に入れない、仲間につさせない、検査室から出さない、自分と仲間と社会を守る行動規範です。

SARS-CoV-2 はバイオセーフティレベル (BSL) 1~4のうち、感染疑い患者由来検体は

BSL2、病原体はBSL3の取り扱いになっています（不活化したSARS-CoV-2はBSL1の取り扱いでよい）。したがって、新型コロナウイルス検査はBSL2【P2レベルの設備（安全キャビネット（セーフティーネット）・物理的封じ込め装置（区域管理と検査室外から内への内向き気流）・二次封じ込め対策（BSL1に必要な設備・手洗い用の流し台・オートクレーブ）・PPE（ガウン・手袋・マスク・必要に応じて顔と目の保護）】とBSL3【P3レベルの設備（エアロックまたは前室を介した自動閉鎖式の両開き戸・検査室内を陰圧に保つ）・PPE（BSL2に準拠）】の対応で行う必要があります。特に、SARS-CoV-2が不活化されるまではBSL2以上の安全キャビネットの中で行わなければなりません。

検査後は、安全キャビネット、機器、作業台、器具等を適切な消毒薬で除染し、安全キャビネット等は可能であればUV照射する必要がある、PPEは感染性廃棄物として廃棄、もしくはオートクレーブ処理する必要があります。新型コロナウイルス検査だけでなく日々の検査業務でも、適切なPPEの着用（検査前にしっかり着用することはもちろんですが、検査中でも適宜手袋を交換するなど）と手指消毒（検査前と検査後だけでなく、検査中に手袋を交換する際なども行うこと）が重要です。

参考資料

- ・「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」. 公益社団法人日本臨床検査標準協議会（JCCLS）, 2021.
- ・新型コロナウイルスの消毒・除菌方法について（厚生労働省・経済産業省・消費者庁特設ページ）,
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/syoudoku_00001.html>
(平井)

重要 B

Q6) クリーンベンチと安全キャビネットは、どのように使い分けをしますか。

A6) クリーンベンチと安全キャビネットは、以下のように使い分けます。

【クリーンベンチ】

- 装置外→装置内へ汚染の侵入を防ぐ装置です。
- 試薬の精製等で用います。クリーンベンチはUVランプのついた層流式クリーンベンチを用いることでPCR実験に適した無塵の環境が得られます¹⁾。
- 室内に不要なものは持ち込まず、常にすっきりとした状態にします¹⁾。
- 使用前後の保守管理は、クリーンベンチ検査機器・器具保守管理標準作業書を参照して行います。また、追加として使用後には0.5%次亜塩素酸で拭いた後、十分な、水拭きをします¹⁾。

【安全キャビネット】

- 装置内→装置外への汚染漏出を防ぐ装置です。

- 感染性を有する検体の前処理および抽出作業には、生物学的安全キャビネットを用います。生物学的安全キャビネットは目的菌またはウイルスによってクラスタイプが異なります¹⁾。
- 臨床検査では概ねクラスⅡタイプのものを用いることが多いです。クラスⅡの生物学的安全キャビネット内部は常に清浄に保持します。クラスⅡの生物学的安全キャビネット内にはエアロゾル発生を回避するためスピンドウン等に使用する小型遠心機や不必要な器具は持ち込まないようにします¹⁾。
- クラスⅡの生物学的安全キャビネットの保守管理は、使用前は 70%エタノールにて清拭し、使用後は危害対策用キャビネット MHE-91AB3 検査機器・器具保守管理標準書を参照して行います¹⁾。

参考資料

- 1) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) , 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス 2021. 日本臨床検査標準協議会. P70.
(副島)

Q7) ウイルス汚染の除去作業の要点は何ですか。

A7) この質問に対しては二つの観点から回答します。

まず、環境表面などのウイルス汚染除去には、次亜塩素酸ナトリウム 0.05%を使用するとされますが、表面消毒には 0.1%、汚染面の消毒には 1.0%の報告もあります。また、遺伝子関連検査の場合、感染防止だけでなく、コンタミネーション防止のために飛散した可能性のある核酸の破壊も必要なことから、クラスⅡの生物学的安全キャビネット、機器、作業台、器具などの一般的な清拭には 0.05~0.1%、汚染時の清拭には 0.5~1.0%で使用します。ただし、クラスⅡの生物学的安全キャビネットの作業台表面や内部壁面など金属部分は腐食を避けるため、除染後は水で改めて清拭する必要があります¹⁾。

次に、SARS-CoV-2 の核酸増幅検査におけるウイルス (核酸) 汚染、すなわち核酸増幅検査でのコンタミネーションが生じた場合の除去作業について記載します。コンタミネーションには、ウイルス核酸の汚染 (クロスコンタミネーション) と増幅産物の汚染 (キャリーオーバーコンタミネーション) があります²⁾。特に後者は PCR に共通する大きな課題であり、偽陽性の原因の一つとされます。予防法は、適切な作業環境と手順、陰性対照の確認、操作者の技術研修などが挙げられます。コンタミネーション除去には、まずコンタミネーションの確認 (早期診断・早期対処が重要) と原因の解析が肝要です。作業者の手を介して多くの箇所へ広がっている可能性が高いため、できるだけ手を使わず、ピンセットなどを使用すること、作業の終了時には触れる箇所を次亜塩素酸ナトリウムで念入りに清拭することが重要です³⁾。

➤ 単発なコンタミネーションの場合

- ① 考えられる原因を一つ一つチェックし、対処します。
- ② 試薬へのコンタミネーションが疑われる場合は、新しいものに換えます。
- ③ 実験台や器具類は 0.5～1.0%の次亜塩素酸ナトリウムで清拭後に十分な水拭きをします。
- ④ ピペット、ピペットチップ、チューブ類も新しいものに交換します。

➤ **検査結果が広範囲で異常を呈したコンタミネーションの場合**

- ① コンタミネーションを起こした部屋を閉鎖します。
- ② 代用できる作業場所がある場合は、そちらで行います。その場合、閉鎖した実験室からのものは使用せず、試薬や器具はすべて新しいものを使用します。
- ③ 化学的方法での DNA 分解：床および周辺等、作業領域（実験台、クラス II の生物学的安全キャビネット、クリーンベンチ等）をそれぞれ文献記載の濃度で次亜塩素酸ナトリウムにより処理します。この場合、金属表面が腐食しないように十分な水拭きをするのを忘れないようにします。
- ④ 部屋やベンチ内など UV 照射可能な領域では UV 照射によって核酸を破壊します。この場合、効果があるのは UV が照射される部分のみであり、陰になる場所や染み込んでいるものに対しては効果がないことに留意します。また、人がいる時には照射しないのはもちろんです。
- ⑤ PCR Clean（フナコシ）などの核酸やアンプリコンなどを除去する市販の除去剤の使用も必要に応じて行います。

最も重要なのは、繰り返しになりますが、起こってから対応するよりも、コンタミネーションが起これないようにすることです。

参考資料

- 1) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS). 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型ウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス 2021. 日本臨床検査標準協議会, p40, p69-74.
- 2) 川上大輔. 新型コロナウイルスの PCR 検査～原理からヒットホールとその対策まで～. ぶんせき 2020 年 10 月号 : p359-365.
<<https://www.jsac.or.jp/bunseki/pdf/bunseki2020/p359.pdf>>

(前川)

Q8) ウイルス汚染の除去作業に次亜塩素酸ナトリウムを使う際の注意事項は何ですか。

A8) 0.5～1.0%に次亜塩素酸ナトリウムを希釈し器具等についたウイルスを除去します。大切なことは、しっかり汚染除去対象物全体を浸漬することです。空中に出ている部分は汚染除去できないためです。除去作業中は皮膚や目に付着させないように注意し、安全キャビネットは発生する塩素を吸い込まないようにファンを稼働させておきます。1～2 分ほど処理し、ウイルス除去作業後は、金属に対して腐食性があるため、十分水拭きする必要があるま

す。

参考資料

- ・「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」. 公益社団法人日本臨床検査標準協議会 (JCCLS). 2021.
- ・新型コロナウイルスの消毒・除菌方法について (厚生労働省・経済産業省・消費者庁特設ページ),
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/syoudoku_00001.html>
(平井)

その他 C

Q9) 検査室の掃除に関して留意すべきことは何ですか。

A9) 安全キャビネット、作業台、機器や器具の清拭は、検体の飛散による作業者の感染防止、および、核酸による PCR 測定系への汚染の観点から行います。後者には検体によるクロスコンタミネーションと、核酸増幅産物によるキャリーオーバーコンタミネーションがあります。目的に応じて、以下の消毒薬を用います。金属部分に次亜塩素酸ナトリウムを使用した場合には、腐食を避けるため、水で改めて清拭します¹⁾。

目的	消毒薬
感染防止のための一般的な清拭	70～95%エタノール、0.05%次亜塩素酸ナトリウム
汚染時の清拭、核酸の破壊	0.5～1%次亜塩素酸ナトリウム

作業終了後、残余検体、検体が付着したチューブやチップ、ディスポーザブルの個人防護具は、施設の規則に従い、ビニール袋に入れて感染性廃棄物として廃棄、もしくは、高圧蒸気滅菌（オートクレーブ）をかけます。チップ類は次亜塩素酸ナトリウム液を入れた容器にネットを被せておき、次亜塩素酸ナトリウム液に浸かったチップをネットごと回収して廃棄してもよいです。

核酸増幅産物の感染性はないため、オートクレーブは排気とともにアンプリコンを部屋中に拡散させる原因となるため「やってはいけない」といえます。増幅産物の飛散によるキャリーオーバーコンタミネーションが起きないように気をつける必要があります。検査室の床は、検体をこぼしたりすることがなければ、通常通りの掃除でよいです。検体をこぼして拭き取る場合は、個人防護具（ガウン、手袋、サージカルマスクまたは N95 マスク、アイシールドまたはフェイスシールド）をつけて、汚染時の清拭を行います。

参考資料

- 1) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS), 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス 2021. 日本臨床検査標準協議会. p40.
(東田)

Q10) 遺伝子関連検査室の空圧管理の考え方を知りたいです。

A10) 新型コロナウイルスの臨床検査は、BSL2+、すなわち、クラスⅡの生物学的安全キャビネットを有するBSL2の部屋で、作業者が个人防护具をつけて行うとされています¹⁾。そのため、部屋の陰圧管理は不要です。ただし、検査中は窓や扉を閉め、許可された人だけが入室できる状態になっている必要があります。新型コロナウイルスの分離や培養の実験を行う場合には、BSL3、すなわち、室内全体が陰圧で、出入り口が前室を挟む二重扉となっており、排気がフィルター濾過などで処理される部屋で行う必要があります。

参考資料

1) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1. 2020.

(東田)

各論 (実際の検査の現場での注意点)

分析前プロセス：検体の前処理工程について

中谷、仁井見、八木、谷本、松永

最重要 A

Q11) 検体保存液として不活化機能を持たない溶液 (輸送液) を使用している場合には、検体の取り扱いにどのような注意が必要ですか。

A11) 以下を厳守してください¹⁾。

- ・使用した容器は紫外線滅菌を行う。
- ・取り扱いには手袋を必ず着用し、検体を扱った手で他の場所を触らない。
- ・触った場合は80%エタノール等で拭き上げを実施する。
- ・検体容器を開封するときは安全キャビネット内で実施する。

参考資料

1) 国立感染症研究所『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 ~2021/03/19 更新版~』 2021年3月.

Q12) 検体保存液として不活化機能を持つ溶液 (輸送液) を使用している場合には、検体を感染物として取り扱う必要はないと考えても良いですか。

A12) 不活化機能を持つ溶液を用いても、基本的に感染物として取り扱う必要があります。容器外面に不活化されていない検体が付着している可能性も考慮すべきです。

Q13) PCR 試薬の取り扱いにおいて、非特異増幅を予防する方法はありますか。

A13) 先ず一般的なPCR試薬の注意事項として試薬の冷蔵等がありますが、各社の試薬で注意事項は異なりますので、反応条件や取り扱い等、試薬の注意書きに従うことが必要です。

また、検査場所（ゾーニング）の徹底（PCR 試薬精製部屋の近くが望ましい）や、PCR 後の増幅産物はオートクレーブ滅菌をしないこと等が極めて重要です。

Q14) PPE 着用はどの程度まで、どの作業まで必要ですか。

A14) 検体採取から、（検体保存液が不活化機能を持つ・持たないにかかわらず*）PCR 前処理における不活化工程まで必要です。* Q12 参照

Q15) 安全キャビネットとクリーンベンチの使用前準備（消毒方法）、使用中の注意（ゾーン分けや手袋を換えるタイミングなど）、使用後の注意（清掃方法）について教えてください。

A15) 以下、それぞれ安全キャビネット/クリーンベンチを分けて説明します。

使用前後の消毒・清掃方法について

➤ **安全キャビネット（患者検体の取り扱い専用）**

使用前：70%エタノールまたは 0.5～1.0%次亜塩素酸ナトリウム^{※1}等で清拭します。

使用后：稼働したまま、機器、作業台、器具などを 70%エタノールまたは 0.5～1.0%次亜塩素酸ナトリウム^{※1}等で清拭し、その後、紫外線を照射します。

➤ **クリーンベンチ（PCR 試薬の分注専用）**

使用前後：0.5-1.0%次亜塩素酸ナトリウム^{※1}等で清拭した後、DNase/RNase フリー^{※2}の超純水で十分に水拭きを行います。

※1：次亜塩素酸ナトリウム水溶液が残存していると、後の検査に影響を与え、金属を腐食するため、十分な水拭きが必要です。

※2：DNase/RNase はそれぞれ DNA・RNA を分解する酵素のことを指します。核酸を取り扱う検査や実験において、DNA・RNA 分解酵素が入っていない（=DNase/RNase フリーの）超純水を用いる必要があります。

使用の際の注意について

➤ **安全キャビネット（患者検体の取り扱い専用）**

- 感染性を有する患者検体の前処理および抽出作業に用います。
- キャビネット内部は常に清浄に保持し、不必要な器具は持ち込まないようにしましょう。
- 予備実験（コールド作業）を実施し、検体分注等キャビネット内で行うすべての作業が完結できるように、予め準備を行いましょ。
- 作業台に作業用ろ紙を敷いて、サンプル等がこぼれた時でも作業台の汚染を最小限にする。サンプル等がこぼれた時は作業用ろ紙を廃棄し、作業台を 0.5-1.0%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で拭き取り、手袋を交換して新たな作業用ろ紙を敷きましょう。

- 作業台上の備品の配置は手の動線を考え、「チップ装着」→「検体容器からのサンプリング」→「PCR チューブへの分注」→「チップ廃棄」が一方通行となるように考慮しましょう。
- 作業者の他に、作業者の消毒などを補佐する人がいることが望ましいです。
- 安全キャビネットから手を出す場合、手袋は交換するようにしましょう。
- キャビネット内で使用したものはすべて感染性の廃棄物として処理しましょう。

▶ **クリーンベンチ（PCR 試薬の分注専用）**

- クリーンベンチや、その中で扱うピペット、チップなどの器具・消耗品はすべて PCR 試薬精製専用にしなさい。
- 室内に不必要なものは持ち込まず、常にすっきりとした状態にしなさい。
- 必ず、新しい手袋で作業をしなさい。別の作業（特に検体の取り扱いなど）で使用した手袋を使用しないようにしなさい。

Q16) 作業中に、着衣や手袋を交換する必要はありますか。(安全キャビネット外の作業では殆ど手袋を換えない人が多い)

A16) 安全キャビネットから手を出した場合は手袋を換える必要があります。患者検体を扱った手袋は汚染源となるため、安全キャビネット外の装置や試薬を触ってはいけません。

重要 B

Q17) 検体保存液に入れていれば、室温で保存・輸送した検体であっても PCR 検査に利用可能ですか。

A17) 検体保存液や不活化液は、それぞれ検体中の核酸（RNA）の保存安定性を保つための条件が異なります。よって、各施設で利用している検体保存液の種類と核酸の安定性条件を把握した上で、適切に輸送条件や保存期間、温度などを管理し、検体を取り扱うことが必要となります。

例：A 社の検体採取液は、検体の安定性として「冷蔵で 24 時間、-20℃で 3 日間を保障」など。

Q18) 検体（スワブ、輸送培地懸濁液、PBS 懸濁液、生理食塩水懸濁液）の保管条件と保管方法について教えて下さい。

A18) スワブは乾燥することを避け、密封できる容器に保管してください。検体採取後は検体保存液の種類（輸送培地懸濁液、PBS 懸濁液、生理食塩水懸濁液）に関わりなく、可能な限り速やかに氷上または冷蔵庫（4℃）に保管し、輸送開始までに 48 時間以上かかる場合は-80℃以下で凍結保存してください。-80℃の冷凍庫がない場合は通常の冷凍庫（-20℃程度）でかまいません。受入検査機関において速やかな検査が困難な場合も医療施設内での検体の保存（-80℃、不可能であれば-20℃）をしてください。

参考資料

- ・国立感染症研究所『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～2021/03/19 更新版～』2021年3月。

Q19) 陽性コントロールを分注するピペットは、検体と同じピペットを用いて良いですか。

A19) 試薬・検体・陽性コントロールそれぞれ専用のものを用意することが望ましいです。最低でも試薬を分注するピペットと検体・陽性コントロールを分注するピペットは分ける必要があります。また、キットによっては高濃度のコントロールを希釈する工程が存在する場合があるので、その場合には検体とコントロールでもピペットを分けることが望ましいです。

Q20) 陽性コントロールは、検体と同じ安全キャビネット内で取り扱って良いですか。

A20) 同じ安全キャビネット内で取り扱っても差し支えありませんが、エアロゾルによるクロスコンタミネーションを避けるため、陽性コントロールの取り扱いには十分に注意が必要です。以下、注意点を列記します。

- ・可能な限り不活化されている陽性コントロールを使用しましょう。
- ・陽性コントロールは最後に分注します。
- ・陽性コントロールのスピンダウン後は30秒～1分ほど静置し、エアロゾルを落ち着かせてから蓋を開けましょう。
- ・蓋が開いているままでチューブを取り扱う場合、ピペット操作をゆっくり行いましょう。
- ・ピペット操作時、蓋が開いているチューブの上をピペットの先端が通過しないようにしましょう。
- ・高濃度のコントロールを扱う場合には、安全キャビネットを分けることが望ましいです。

Q21) 出血を伴った検体は、どのように取り扱えば良いですか。

A21) 各社の試薬によって影響が異なるため一般的なことは言えません。検査キットによっては影響を受ける可能性があるため、まずは核酸精製を実施せずにキット添付文書、あるいはメーカーに直接確認してください。

例：A社試薬の場合、ヘモグロビン濃度1000mg/dL程度は影響がない、等。

その他C

Q22) 検体分注用ピペットは、複数の検体を分注する度にアルコール綿で拭きとり作業をする必要がありますか。

A22) 検体保存容器から直接ピペットを用いて検体を吸引する場合には、ピペット本体が容器の内部に接触し汚染される危険があるため、毎度清拭を実施する必要があります。

ピペットを清拭する場合、アルコールではウイルスのRNAを破壊することはできず、コンタミネーションが発生する可能性があるため、次亜塩素酸ナトリウム水溶液で拭きとって

ください。なお、次亜塩素酸ナトリウム水溶液が残っていると後の検査に影響を与えるので、しっかりと水拭きすることも留意ください。ただし、検体保存容器から使い捨ての滅菌スポイトで別の 1.5 mL チューブ等に検体を少量移し、そこからピペットを用いて分注するなどの工夫をすると、ピペット本体が汚染される可能性が減るため、このような場合には検体を分注する度の清拭が不要です。また、チップは検査用のフィルター付きチップを使用し、エアロゾルを発生させないように、ピペット操作を慎重に行うことも大切です。勿論、少しでも汚染された可能性がある場合には清拭して除染する必要があります。

Q23) 試料の前処理に使用する容器は、滅菌したものを使用する必要がありますか。また、RNase free は必須ですか。

A23) 市販の検査キット内の検査試薬やディスポーザブルプラスチック容器類は、通常 RNase free と考えられますが、検査室で用意するマイクロ遠心チューブやピペット用チップなどは滅菌し、RNase free である必要があります。乾熱滅菌や火炎滅菌では RNase を確実に除去することができますが、オートクレーブだけではわずかに残る可能性があることに留意が必要です。

Q24) 不活化剤入り輸送培地は使用可能ですか。

A24) 検査キットごとに検査系が異なり、推奨する試薬が異なるため、使用する検査キットの添付文書、検査薬メーカーに確認してください。

Q25) 粘性のある検体と試薬を混合する際に注意すべき点を教えてください。

A25) 粘性のある検体の分取では、定量が不正確となる可能性があり、先切りピペットチップを使用し、適正量を分取できているか、ゆっくり吸引して既定の液量を分取できるように目視確認することで、検体量が過不足ないよう気をつけましょう。混和させる必要がある場合は、チューブを開栓時の飛び散りを防ぐため、スクリュューキャップ、オーバーキャップであるものが望ましいです。攪拌後は遠心をして混合液を容器下部に集めることが必要です。

Q26) チューブ等を氷冷する際に注意すべきことはありますか。

A26) チューブ等に、氷や結露水が混入しないように注意しましょう。また、氷と直接接することなく、急速に冷却するために、クーリングブロックなどの使用を考慮してください。

Q27) DNA と RNA の取り扱いでそれぞれ注意しなければならない点は何ですか。

A27) RNA は DNA と比較して不安定ですが、RNA が不安定とされる主な原因は RNase のコンタミネーションです。このため、RNase がコンタミネーションしないよう、コンタミネーションしても作用しないように、以下のことに注意してください。

- RNA 用の器具、試料には素手で触れないように手袋を常に着用しましょう。

- RNA は不安定であるため、取扱いは低温で迅速に行い、高純度化、高濃度化においてはアルコール沈殿による濃縮やまた RNase のコンタミネーションを留意し、酵素の活性を阻害するタンパク変性剤入りの溶液から RNA を精製する方法が望ましいです。

Q28) 核酸抽出と精製の違いは何ですか。

A28) 「抽出」はウイルス内部にある核酸を外部に出すことであり、「精製」は夾雑物から核酸を単離することです。

Q29) ピペットの使用方法で注意すべきことを教えてください。

A29) チップはフィルター付きを用いてください。ふきだし（押しだし、ブローアウト）は飛び散り（エアロゾル発生）の可能性があるため リバース法を用い、あらかじめ規定量よりも多めに吸引し、排出時に規定量を排出するようにしましょう。

Q30) ボルテックス・スピンドウンをする際の留意するべき点を教えてください。また、凍結乾燥品のチューブを開ける前にも、遠心が必要な理由は何ですか。

A30) 先ずボルテックスでは泡の影響を受ける酵素等もあるので、泡が出るほどまで極度にボルテックスをし過ぎないように注意しましょう。チューブについては、ボルテックスの必要がある場合はスクリュウキャップであるものが良いでしょう。キャップ一体型は開封時、飛び散りの可能性があります。また、飛び散り防止のため、攪拌後はスピンドウンをして液をチューブ下部に集めることが必須です。凍結乾燥品のチューブを開ける時には、粉体が飛散して汚染源となるため、やはりスピンドウンが必要となります。

Q31) フィルター付きチップを使う理由は何ですか。また、疎水性でなければいけませんか。

A31) クロスコンタミネーション防止のためです。フィルター付きチップを使わない場合、エアロゾルがピペット内部に入り、他の試薬等にクロスコンタミネーションする可能性があります。特に疎水性のフィルターはエアロゾルや液体によるクロスコンタミネーションの防止に優れていますので、使用が望ましいと言えます。

Q32) 検体として不適切なものはどのようなものですか。

A32) 検体量が極端に少なく、検体採取・輸送が適正に行われていない可能性があるものは注意が必要です。特に、メーカー指定外の容器や、グアニジン塩を主成分とする不活化剤入り輸送培地など、核酸を精製する必要がないダイレクト法では使用できないことがあるので、キットの添付文書、メーカーに確認を取るようにしてください。

各論（実際の検査の現場での注意点）

分析プロセス：（リアルタイム）PCR の実施について

下澤、大場、西田、小林、池尻

最重要 A

<精度管理に関して>

Q33) RT (逆転写) の精度管理はどうしますか。

A33) 新型コロナウイルスポジティブコントロール RNA が様々なメーカーで販売されています。ただし、検査試薬によっては検出できない配列の場合があるので注意が必要です。毎回の測定時に検体と同じように用い、統計学的な許容範囲を設定して精度管理を実施するのが良いと思われます。検体種によって異なりますが、鼻咽頭や鼻腔ぬぐいの場合は、採取が不十分でない限りほぼ 100% ヒト遺伝子が入ります。問題は唾液です。唾液は一般的に粘性があるので希釈 (3~5 倍程度) ・遠心することが必要です。さらに粘性が高い場合はもう一段階希釈をします。その場合、わずかではありますが IC が立ち上がらないケースもあります。タカラ試薬では PCR 反応液にメーカー別売のヒト遺伝子 (ヒト RNase P 遺伝子) を添加しています。ロシュ試薬 (コバスシリーズ、LIAT) の場合は現法のままです (試薬の詳細については非開示)。PCR のサイクル数は感染研法 (研究検査依頼時で実施)、タカラ試薬は 45 回です。(飯田)

「IC (内部コントロール) として、RNA および DNA IC の共通の役割としては、規定内の Ct 値で立ち上がった場合に PCR の反応系に問題がないことを確認することです。一方で、DNA を用いる試薬、RNA (β -actin、B2M などの内在性 RNA など) を用いる試薬では評価できる範囲 (逆転写反応を含むかどうか) が異なる」ことに注意が必要です。IC として、検体中の RNA の品質を確認するためには、症例を問わず安定した発現量を保有し、SARS-CoV-2 と同時に PCR 反応を行った際に規定範囲の Ct 値で立ち上がる遺伝子を IC として選定する必要があります。内在性 RNA を利用する利点としては、検体採取量の不足や検体の取り扱いによる検体中の RNA の分解度を把握できることが挙げられます。検体採取量や夾雑物質、検体の保管方法などに問題がなかった場合につきましては、IC の Ct 値はある一定の範囲内で立ち上がりが見られることから、この値を検体の品質や採取量の指標として利用可能と判断しています (吉本)。RT-PCR では、本手順書とは異なる方法 (原理) を用いた診断キットも保険収載されています。例えばミュータスワコー g1 の RT-PCR-CE 法では次の点が異なります。

- プローブは用いず、蛍光プライマーを用いている点
- 検出は、生成物の一部を電気泳動で解析することにより行っている点
(谷本)

以上のように各検査法の特徴や詳細をよく理解して臨床検査に従事することが必要です。

重要 B

<IC に関して>

Q34) IC (内部コントロール) として、添加された DNA を用いている検査試薬もあり

ますが、検査上どのように考えれば良いですか。

A34) PCR による増幅工程が正しく起こっていることの指標になります。PCR 反応の内部精度管理に使えますが、RT (逆転写反応) の精度管理はできません。

Q35) IC がない試薬の場合、増幅阻害を判断する方法はありますか。

A35) IC がない市販の専用キットでは判断することができません。

理由) IC が増幅していることで、PCR 反応が成功している (増幅阻害が起きていない) と判断しているためです。

対応) そのような場合、キットを用いずにコロナウイルスを検出するチューブとは別のチューブを用意し、IC を増幅させます。つまり 1 検体につきコロナウイルス用、IC 用の反応チューブにてそれぞれ逆転写反応・PCR 反応を行います。そして IC が増幅、コロナウイルスが増幅しなかった場合、陰性と判断します。両方とも増幅すれば陽性と判断します。IC が増幅しなければ再検査をします。

<最小検出感度、検査の感度・特異度に関して>

Q36) 検体から抽出キットを用いて抽出した RNA を用いる検査と、RNA 抽出を行わず検体をダイレクトに RT-PCR にかける検査とで検出率を比べた場合、どのような差が出ますか。

A36) 核酸抽出することによって、検体中の夾雑物の除去、RNA の濃縮を行えるので検出率は高くなると考えられますが、厚生労働省の EQA の結果からは差がないと考えられます。

<原理に関して>

Q37) LAMP 法とはどのような方法ですか。また、唾液検体だと LAMP 法で偽陽性が出やすいというのは本当ですか。なぜ偽陽性になるのですか。

A37) LAMP 法の原理については、EikenGenomeSite

(<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>) をご参照ください。唾液を検体として使用した際に非特異反応が生じることがあります。非特異反応は室温での操作が想定より長いなどの理由により十分に試薬の温度が下がっていない場合において、プライマー同士が非特異的に結合しプライマーダイマーを形成することに生じるものと推測しております。特定までには至っておりませんが、検体中の夾雑物により非特異反応が助長されるケースも認められておりますが、現在、先に示しました氷冷操作や栄研化学の試薬改良により低減化しております。(副島)

Q38) マルチプレックス PCR と一項目の PCR で感度に違いはありますか。

A38) マルチプレックス PCR は複数のプライマーセットが単一チューブ内に存在するため、感度が低下する場合がありますが、体外診断用医薬品として販売されている検査試薬は感度が低下しないように精製されています。

<最小検出感度、検査の感度・特異度に関して>

Q39) 通常の PCR と専用機での PCR だと使用する検体量が異なりますが、感度に違いはありますか。

A39) 各検査キットにより、PCR 反応に使用する検体量（ウイルスのコピー数）が異なるため感度も異なります。

理由) 例として A 社では 5 μ L の検体量を、B 社では 200 μ L の検体量を用いて PCR 反応を行った場合、この時点で 40 倍の差が生じています。

同じ検体を、異なる試薬やサーマルサイクラーで検査すれば、大体は検出感度が異なります。また通常の PCR が定性的（エンドポイント PCR）である場合、用いる機器、試薬、プライマー、検体量、熱反応ステップ等の最適条件を求め、その系で検査をします。

その他 C

<原理に関して>

Q40) PCR 検査で機種によって速さが違うのは何故ですか。

A40) RNA をゲノムに持つコロナウイルスを検出するためには、①逆転写反応(RNA \rightarrow DNA)と②PCR 反応が必要です。キットによって①と②の反応時間が異なっているため、最終的な結果までの所要時間に差が生じます。反応溶液調製や RNA 抽出などを手作業で行うか、機器が全自動で行うかによっても所要時間が異なります。

Q41) ロシュ製品にはプロセスコントロール (RNA) が含まれていますが、これはどのような意味がありますか。

A41) プロセスコントロールとは抽出から PCR 結果までのすべての工程をモニタすることができる外因性の陽性コントロールです。検体が RNA である場合は DNA である場合に比べて分解や阻害の要因が多くなります。そこで、プロセスコントロールも DNA でなく検体に合わせて RNA を採用しています。(西田)

Q42) LAMP 法で反応が 30 分を超えたあたりで、陰性であるにもかかわらずわずかに増幅することがありますが、その原理はどのようなものですか。

A42) LAMP 法で 30 分を超えたあたりで陰性なのにわずかに増幅するケースにつきましては、非特異反応が考えられます。非特異反応は、室温での操作が想定より長いなどの理由により十分に試薬の温度が下がっていない場合において、プライマー同士が非特異的に結合しプライマーダイマーを形成することに生じるものと推測しております。また、特定までには至っておりませんが、検体中の夾雑物により非特異反応が助長されるケースも認められておりますが、現在、先に示しました氷冷操作や弊社での試薬改良により低減化しております。ただし、弊社での確認の結果、このようなケースは必ずしもすべてが非特異反応ではなく、特異的反応であることもございます。なお、両者を増幅曲線にて区別することは困難です。

教科書レベル

<分析中の操作に関して>

Q43) 試薬、検体等の量が極めて微量のため操作が難しいと感じています。また、PCR チューブの開閉等、細かい操作に慣れていないため苦勞します。扱い方やコツなどはありませんか。

A43) ピペット操作を練習して慣れていただきたいです。

キャップの開閉は、チューブキャップオープナーを使用してはいかがでしょうか。

また、使用量が微量 (0.5 μ L レベル) の操作に慣れていないならば、例えば 10 本分の反応溶液を調製して、微量操作を避け、1 本 1 本に分注することをお勧めします。

<原理に関して>

Q44) (リアルタイム) PCR の原理がわかりません。

A44) 臨床検査でよく用いられているリアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) について Polymerase Chain Reaction (PCR) は、①熱変性、②アニーリング、③伸長反応によって目的の DNA 領域を増幅させる方法です。この PCR によって増幅する DNA 量をリアルタイムに測定する方法が、リアルタイム PCR 法です。

参考資料

・北篠浩彦. 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド. 羊土社. 2008. P20.

分析後プロセス：松下、吉本、曾家、丸瀬、石毛、大場

最重要 A

Q45) PCR 検査の増幅曲線の縦軸と横軸の意味は何ですか。

A45) 縦軸：蛍光強度 (PCR 増幅産物の量を反映する)、横軸：PCR サイクル数を表します。
(参考資料 1)

Q46) Ct 値、Cp 値、Cq 値といろいろありますが、それぞれ何を示していて、何が異なるのですか。

A46) (以降は Ct 値について記述するが、Cq 値も基本は同様です：編集部注)

リアルタイム PCR において、増幅曲線と閾値 (Threshold) が交差するサイクル数のことです。この Threshold Line と交わったサイクル数は、閾値サイクル (threshold cycle: Ct)、クロッシングポイント (crossing point: Cp)、テイクオフポイント (take-off point: TOP) などが用いられています。リアルタイム PCR のサイクル数を表す表現は解析方法やメーカーにより異なりますが、定量に用いられるという意味では同じ役割をしていると言われます。一般的な表現としては、quantification cycle (Cq) と表現されることがあります。すべて同じ値を指しています (MIQE ガイドラインでは Cq を推奨しています)。(石毛)

参考資料

- ・ Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 ; 55:611-22.
- ・ MIQE: The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem 2009 ; 55:611-622.

Ct 値の算出方法には、閾値と増幅曲線の交点を Ct 値とする方法（Crossing Point 法）の他に、増幅曲線の 2 次導関数を求めてそれが最大となる点を Ct 値とする方法があります（2nd Derivative Maximum 法）。前者では、閾値を指数関数的増幅域の任意の位置に（自動もしくは手動で）設定して解析しますが、その位置により Ct 値が変化するので実験間の誤差が大きくなりやすい傾向があります。一方、後者は、最も増幅速度の変化率が大きい時点を Ct 値とするので、閾値により Ct 値が変化することがなく再現性が高く、また、装置の検出誤差による影響も排除できるため高精度と考えられています。（吉本）

リアルタイム PCR 法の場合は核酸増幅に必要なサイクル数（Ct 値）より定量的に表現できますが、陽性判定のカットオフ値をあらかじめ予備検討を行い試薬と装置に応じて設定しておく必要があります。カットオフ値を超えて核酸増幅曲線が立ち上がってきた場合や陽性コントロールと傾きが異なる核酸増幅曲線が得られた場合は、判定保留として再検等の精査を行います。精査の方法としては、リアルタイム PCR 法による再測定に加え、前回値チェックを含む診療録の確認、抗原検査など他法での確認、増幅産物の塩基配列の確認等が挙げられますが、それぞれ状況に応じて対応します。リアルタイム PCR 法では Ct 値より検体中に存在するウイルス核酸量（コピー数）を推定することができます。低い Ct 値ではコピー数が多く、逆に高い Ct 値ではコピー数が少ないと判断します。さらに高 Ct 値の場合には、例えば核酸増幅が確認されても、その検体から感染性を示すウイルスが分離されにくくなることに注意が必要です（「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイドライン」J CCLS 版。2021 年 6 月。62 ページ）。（松下）ただし、採取された検体の Ct 値は種々の要因（検体採取など）により影響を受けるので、その多寡をもって病勢や感染性などを判断することは困難です。（石毛）

参考資料 1

- ・ <<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt1-3.pdf>>

その他、Ct 値の解釈に対しては下記の検討が参考になります。

- ・ COVID-19 有識者会議「感染拡大防止の鍵となる社会的 PCR スクリーニング」,
<<https://www.covid19-jma-medical-expert-meeting.jp/topic/6489>>

Q47) Ct 値に国際的な基準はありますか。

A47) PCR 検査法の手法（特に検査への検体の持ち込み量、核酸抽出精製の有無、反応系へ

の核酸の持ち込み量) が方法によって異なるため、最小検出感度や同一検体を測定した際の Ct 値は検査方法ごとに異なります。よって、Ct 値のカットオフも PCR 検査一律に決められるものではありません。同じ Ct 値のカットオフを採用したと仮定すると、同程度の最小検出感度を得ようとするれば、必然と Ct 値のカットオフは変わるものです。したがって、統一した基準が作れるものではないと考えられます。(大場)

Q48) 同じ Ct 値を採用している検査は同じ感度を有していると言えますか。また、同じ RNA 溶液であれば、使用する PCR 試薬や機器が異なっても、Ct 値は同じになりますか。

A48) PCR 検査の手法(特に検査への検体の持ち込み量、核酸抽出精製の有無、反応系への核酸の持ち込み量) が各種キットや試薬、方法によって異なるため、カットオフに同一の Ct 値を採用している検査系であっても、最小検出感度は同一とは限りません。さらに、PCR 検査における各工程の効率(抽出効率、逆転写効率、増幅効率) は各種キットや試薬、手法、操作によって異なり、PCR 装置によって Ct 値算出アルゴリズムも異なるため、同じ検体を用いた場合であっても、Ct 値は異なる可能性が高いと考えられます。(吉本)

Q49) PCR 検査の結果の判定について、例えば Ct 値 40 を超えて立ち上がりが見られた時に、再検、結果の解釈、臨床への報告の仕方についてのルールはありますか。

A49) 各社試薬の添付文書に従い、判定および再検を実施します。また、各施設において、使用する試薬の Ct 値について何コピーまでを許容するか、再検査するかについても検証し、陽性判断の基準を設定することも必要です。システムによってはソフトウェアが陽性判断まで行うものがありますが、それを利用する場合には陽性判断のアルゴリズムを理解しておく必要があります。

参考資料

- ・「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」 J CCLS 版。2021 年 6 月。67 ページ。(松下)

Q50) 前日の検査で Ct 値 20 前後、当日検査で PCR が陰性になった時の対応はどうしたら良いですか。

A50) 試料と同時に測定された陰性コントロール、陽性コントロールの測定結果を参照し、偽陽性、偽陰性の可能性の検証後、再検査実施されることを推奨します。(曾家)

検体がうまく採取されていない場合などが考えられるため、PCR だけでなく検体採取も含めた再検査を推奨します。(石毛)

Q51) 抗原定量検査で陽性と出た検体に、念のため PCR 検査をすると陰性と出ました。どのように扱ったら良いですか。また、その出現頻度はどのくらいですか。

A51) 定量抗原検査キットのルミパルス SARS-CoV-2 Ag (製造販売承認番号：30200EZX00035000) の審査概要¹⁾ や添付文書¹⁾ に、以下の例が紹介されています。RT-PCR 法との比較において「判定不一致となった RT-PCR 法陰性検体 8 例は全て RT-PCR 法陽性歴のある 検体²⁾ であり、発症から 9 日～23 日目の回復期の症例で、カットオフ値の近傍³⁾ において認められました。

脚注 2：入院時には PCR 陽性だったが、本研究時には陰転化が検討された症例由来の検体

脚注 3：「1-10pg/mL が 4 例、10-50pg/mL が 2 例、50-100pg/mL が 2 例」とありますように、タンパクを見る抗原検査でしっかり出るものが、特に発症から日数がたった回復期の検体では RNA をみる PCR 検査では出ないものもあるようです。この事例では $8/325=2.4\%$ との出現頻度となります。(大場)

また、抗原検査と PCR 検査ではサンプリングに用いる綿棒が異なるため、完全な同一検体として考えることはできません。一方で、サンプリングに問題がなかった場合については、抗原検査、PCR 検査それぞれの偽陽性、偽陰性の可能性を鑑みた上で、総合的にどちらの結果が正しいのかを判断する必要があります。

参考資料

1) <<https://www.mhlw.go.jp/content/11124500/000642329.pdf>>,
(2021.11.15 最終確認).

Q52) PCR の Raw データを確認すると波形の乱れがある検体があります。どのような対策がありますか。

A52) 装置の設定、操作での反応液の泡立ち、検体特有の成分の影響などケースバイケースで、ケースに応じて検証し対策する必要があります。(大場)

Q53) 偽陽性となりうる要因にはどのようなものがありますか。

A53) 以下の二つの可能性が考えられます。

- ①非特異増幅による偽陽性は、試薬の取り扱い不良（冷却下での保存を行っていないなど）によるプライマーダイマーの産生が要因と考えられます。
- ②コンタミネーションによる偽陽性は、陽性検体や陽性コントロール、そして増幅産物の検査系へのコンタミネーションが要因と考えられます。(吉本)
増幅産物がコンタミネーションの主要な原因となるので、PCR 後の反応液は蓋を開けずに廃棄します。(石毛)

Q54) 偽陰性となりうる要因にはどのようなものがありますか。

A54) 以下の①～⑤の可能性が考えられます。

- ①RNA の分解：検体の取り扱いの不良（保存条件：温度や時間や、体液等からの RNase の混入）に起因します。

- ②試薬の反応性の低下：試薬の不適切な取り扱い（高温下での保存、蛍光試薬を遮光せず保管、メーカー上限を超えた凍結融解回数など）に起因します。
- ③操作不良：試薬分注量の過不足など、試薬および装置の操作方法が不適切であったことに起因します。
- ④装置の動作不良：レーザーや受光部の不良、温度制御エラーが出現する場合には、偽陰性となる可能性があります。定期メンテナンスや精度管理を行い、装置が正常に動いていることを確認することが重要です。（吉本）
- ⑤各社試薬の性能に影響を及ぼす変異株の発生：各社試薬のプライマー&プローブ認識配列に変異を有する変異株を測定する場合には、増幅されない、あるいは増幅が遅延する可能性があります。そのため、各社が提供する変異株の調査情報を随時確認することが重要です。不明な場合は各社へお問い合わせください。変異株による増幅への影響が疑われる場合には、変異検査の実施が有効です。（吉本）

総論 Q1、Q2 を参照してください。分析感度、診断感度の記載を参考に整理して考えてください。（松下）

Q55) 他の検体の結果に比べて蛍光が全体的に低いのですが、問題ないですか。あるいは逆に他の検体の結果に比べて蛍光が全体的に高いのですが、問題はないですか。

A55) 蛍光強度が低くても、判定に影響しない程度であれば問題はありませんが、蛍光強度が極端に低く判定が難しい場合は、再検査を推奨します。蛍光強度低下の要因としては、検体などに起因する PCR 反応阻害（非特異増幅含む）や PCR 装置のトラブルの可能性が考えられます。検体を直接 PCR 試薬で増幅する検査においては、PCR 装置のトラブルが考えにくい場合には、PCR 反応阻害物質の濃度を下げることが目的として、検体を希釈しての再検査を推奨します。また、プライマー&プローブの認識配列に変異を有する変異株を測定する場合にも、蛍光強度が極端に低くなったり、増幅が遅延する場合があります。一方で、蛍光強度が高い場合については、増幅曲線の形状に異常がなければ、問題はないと考えられます。ただし、シグモイド型の増幅曲線でない場合には、非特異増幅の可能性が考えられます。（吉本）

重要 B

<検体の特性に関する内容>

Q56) 同じ患者から採取された、唾液と鼻咽頭ぬぐい液ではウイルス量はどちらが多いですか。

A56) 唾液と鼻咽頭ぬぐい液との間には高い一致率が認められています。以下の論文をご紹介します。

- ①Lorenzo Azzi, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. J Infect 2020 ; 81(1) E45-E50.

Published: April 14, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>

②厚生労働省科学研究版（北大：豊嶋班）の「無症状者の唾液を用いた PCR 検査等について」：

鼻咽頭と唾液の一致率（PCR）：90.1%

鼻咽頭と唾液の一致率（LAMP）：90.1%

③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：「新型コロナウイルス感染症の診断における鼻かみ鼻汁及び唾液の有用性の検討」。発症から 9 日以内の症例では、鼻咽頭ぬぐい液と唾液との結果に高い一致率が認められた。

Q57) 陽性になった患者が 1 か月経過後も、PCR 陽性となります。どの程度まで陽性と検出されますか。

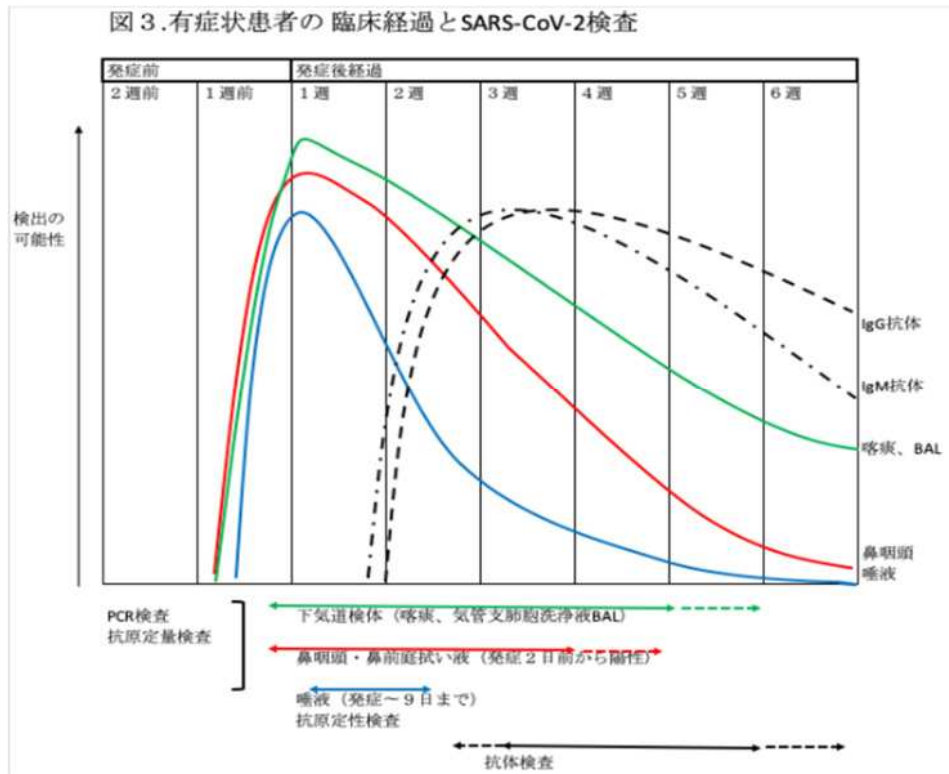
A57) PCR 検査ごとに最小検出感度やカットオフ基準値が添付文書等で公開されておりますのでそちらを参考にしてください。（吉本）

症状が軽快したのちも、数週間にわたって遺伝子検査が陽性を示すことが報告されています。一方で、ウイルスの分離は発症後 8 日目までであり、その後のウイルスの分離はみられていません。遺伝子検査陽性が必ずしも感染性ありとはならない可能性が示唆されています。

参考資料

- ・ COVID-19 検査法および結果の考え方（2020 年 10 月 12 日）、日本感染症学会,
<https://www.kansensho.or.jp/modules/topics/index.php?content_id=47>

有症状患者の臨床経過とウイルス検査の関係について、以下の図を参考にして下さい。



引用文献：「COVID-19 感染対策における PCR 検査実態調査と利用推進タスクフォース」
中間報告書解説版「PCR 検査の利用の手引き:保険適用の行政検査を中心に」 図3 (石毛)

<検査性能に関する内容>

Q58) 様々なキットを同時比較した成績はありますか。

A58) 厚生労働省委託事業「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」報告書. <<https://www.mhlw.go.jp/content/000769978.pdf>>の外部精度管理調査の結果 (p.21) を参照してください。

<検査結果の判定に関する内容>

Q59) 測定結果の判定と臨床的背景が一致しない場合は、どのように考えれば良いですか。

A59) [患者内のウイルス量 (Viral load)] ≠ [検体中のウイルス核酸量] ≙ [Ct 値]と考えられており、検体中のウイルス核酸量は Ct 値で推定できるものと解釈できます¹⁾。ただし、方法などが異なる施設間での Ct 値の比較は困難であり、精度管理が適切に行われた同一施設内での評価に限定されます。AACC²⁾では、患者内のウイルス量や感染性が検体中のウイルス核酸量と相関することについては確立した根拠がなく、採取された検体の Ct 値は種々の要因により影響を受けるため、その多寡をもって患者ケアのガイドにすることは推奨できないと記載されています。これは検体中の核酸が感染性を有するウイルス由来なのか、核酸

の断片なのかの判断が難しいことも一因です。(吉本) これについて JAMA 論文³⁾では、“In some cases, viral RNA has been detected by RT-PCR even beyond week 6 following the first positive test. A few cases have also been reported positive after 2 consecutive negative PCR tests performed 24 hours apart. It is unclear if this is a testing error, reinfection, or reactivation. In a study of 9 patients, attempts to isolate the virus in culture were not successful beyond day 8 of illness onset, which correlates with the decline of infectivity beyond the first week.” とあり、発症から 1 週間もすると培養は成功しないが PCR 陽性は比較的長く続くことが報告されています。

したがって、『採取された検体の Ct 値は種々の要因（検体採取など）により影響を受けるため、その多寡をもって病勢や感染性などを判断することは困難である』ことを理解することが臨床検査としては重要です。実際に同一患者・同一タイミングで提出された検体で、抗原定量検査が陰性・PCR が陽性 (Ct20 前後) になったケースがあります。抗原定量検査の残試料を PCR で検査すると Ct は 35 以上と極めて微量でした。逆に PCR 用の検体で抗原定量検査を行うと陽性になりましたので、検体採取の影響が大きいと考えられます。(石毛)

参考資料

- 1) 「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」 J CCLS 版. 2021 年 6 月.
- 2) AACC Recommendation for Reporting SARS-CoV-2 Cycle Threshold (CT) Values
Date: JUL.7.2021 // Source: AACC
- 3) Sethuraman N, et al. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020.

■ 一般的な解釈

- 臨床的背景；陰性、PCR 検査結果；陽性の場合：
無症候感染者や偽陽性の可能性も含めて検討されることを推奨します (Q&A：53 偽陽性の項を参照してください)。(吉本)
- 臨床的背景；陽性、PCR 検査結果；陰性の場合：
偽陰性の可能性も含めて検討されることを推奨します (Q&A：54 偽陰性の項を参照してください)。また、プライマー認識配列への変異があった場合、増幅されないこともあるため、変異検査の実施も有効と考えます。(吉本)

<検査手法間の比較>

Q60) 抗原陽性、PCR 陰性の場合、どのような原因が考えられますか。また、その対応方法や出現頻度について教えて下さい。

A60) ・考えられる原因

- ① PCR 偽陰性：科学的な理由の他、技術的な理由（検体の採取、核酸抽出精製、PCR などの各工程での不具合）でも偽陰性が起こり得ます。またプライマー認識部位に変異が入っている場合なども偽陰性となります。偽陰性の項、Q54 を参照してください。

②抗原偽陽性：検体採取方法、検体処理（綿棒の種類、粘性等）、陽性コントロールや陽性検体のコンタミネーションの可能性、免疫血清検査における非特異反応などが要因として考えられます。

・対処方法：

- ①偽陰性要因の対策を実施して再検
- ②検体の遠心分離、吸収試験

・出現頻度：不明

（参考資料：Q&A：51の項を参照してください）

その他 C

<検査結果の判定>

Q61) cobas6800 では、操作画面に増幅曲線が表示されませんが、偽陽性に気がつくにはどうしたら良いですか。また、閾値の設定は PCR 装置の自動モードを利用してても良いですか。

A61) コバス 6800 では、複数の因子から総合的に PCR 増幅を判断し解析アルゴリズムを確定していますので、増幅曲線は提供されません。そのため、添付文書に沿った適切な検体前処理を実施の上、システムに架設していただくことが重要となります。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて、担当医師に総合的に判断していただくこととなります。また、閾値の設定については、測定項目によって独自の設定が測定機に登録されており、ユーザーが手動で設定するものではありません。（西田）

PCR 装置、試薬によって閾値の設定方法が自動や固定、手動など相違があるため、試薬ごとにメーカーの指示に従って適切な方法で閾値設定をする必要があると考えます。

増幅曲線の形状などにより Ct 値が正しく算出されない場合があるため、結果の判定は、Ct 値の確認だけでなく、増幅曲線を確認することが重要と考えます。（吉本）

<検査性能>

Q62) 使用する製品によって、持ち込み患者検体量が異なるにもかかわらず、PCR 反応の部分の感度のみを比較することに意味はありますか。

A62) 感度の評価については、各社添付文書に記載されている最小検出感度を参考にしていますが、各社で単位が異なることにご注意ください。（吉本）

<その他>

Q63) PCR 後の廃棄物を捨てる際に注意すべき点は何ですか。

A63) 増幅産物によるコンタミネーション防止の観点から、PCR 反応後のチューブを開けたりオートクレーブ処理せず、ジッパーバック等に入れて確実に封をしてからメディカルペーパーなどの密閉容器に入れて廃棄することを推奨いたします。（吉本）

Q64) Ct 値と症状の有無や重症度に相関がありますか。

A64) 患者病日と各病日の平均 Ct 値に高い相関を認め、患者上気道検体中のウイルス量は発症後時間経過に伴い低下することが以下の論文で紹介されています。

参考資料

- ・ <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2523-related-articles/related-articles-485/9765-485r09.html>>

一方で、『採取された検体の Ct 値は種々の要因（検体採取量など）により影響を受けるため、その多寡をもって病勢や感染性などを判断することは困難である』ことを理解することが臨床検査としては重要です。（Q&A：59の項を参照してください）（吉本）

デルタ株は他の変異株に比較して、感染者のウイルス数が多く、Ct 値が低い状態が長く続き入院期間が長くなるとの報告があります。重症化に対しては不変とされます（国立感染症研究所 HP より）が、一方で基礎疾患のない40～50代でも重症化する症例が報告されています。デルタ株の重症化リスクについては、今後の検討が必要です。

デルタ株で知っておくべき八つのことは以下の通りです。

1. 感染性が強い。
2. 症状は同じ。
3. ワクチン接種していない人に感染しやすい（ワクチンが推奨される）。
4. ブレイクスルー感染が起こりうる（まれ）。
5. 爆発的感染の原因となる。
6. ワクチン接種せずに感染した患者はワクチン接種を受けておけばよかったと思う。
7. 専門家はワクチン接種にくわえてマスクを推奨している。
8. 今後は他の変異株（バリエーション）も起こりうる。

参考資料

- ・ UC Davis Health より引用。
<<https://health.ucdavis.edu/coronavirus/COVID-19-information/delta-variant.html>>
- ・ 国立感染症研究所「国内流行初期の SARS-CoV-2 デルタ株国内探知症例の疫学的、分子疫学的特徴について」
<<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2502-idsc/iasr-in/10796-501c03.html>>

（松下）

【デルタ型についての結論】

デルタ型は従来型よりもウイルス量が多く感染力が強く（天然痘よりも強く水痘なみ）症

状も重い。しかし致死率はあまり変わっていない。

デルタ型は、これまでの SARS- CoV-2 とは違って、感染力が高く、その基礎再生産数 (R0) は 5 から 9 の間より重症の可能性が高いです。(因みに天然痘と水ぼうそうの R0 値は、それぞれ、5.0 と 8.0 程度)。ワクチンはデルタの重症化には > 90% 有効です。しかし、ワクチンはデルタ感染予防に対しては、65~85% の有効性です。このため、ワクチン接種者へのブレイクスルー感染と非接種者への感染を起こします。マスク、ソーシャルディスタンスのような、薬剤によらない予防策 (Non-pharmaceutical Intervention, NPIs) が必須です。

参考資料

- ・ <https://fm.cnb.com/applications/cnb.com/resources/editorialfiles/2021/07/30/CDC_slides.pdf>
- ・ 黒木登志夫 コロナウイルス arXiv(30). <<https://shard.toriaez.jp/q1541/045.pdf>>

Q65) 試薬ごと、施設ごとの Ct 値をどのように比較すれば良いですか。

A65) PCR 製品間、施設間の性能比較には、Ct 値を比較するのではなく、EQA など同一検体を測定した場合の検出結果などを用いて評価を行うことが望ましいと考えます。なおこの場合、EQA の結果にはオペレーターの操作手技や抽出工程の有無などの製品特性を含む、複数の要因が合わさった結果であることを理解しておく必要があります。また、試薬ごと (試薬ロット間差) の比較には、内部精度管理が有効と考えます。検体をダイレクトに逆転写反応およびリアルタイム PCR 反応にかける簡易抽出試薬の場合には、増幅曲線の立ち上がりの Ct 値を記録し、抽出ステップから 1 ステップ、あるいは 2 ステップでのリアルタイム PCR 反応で定量まで行う場合には、Threshold Line との交点の Ct 値を確認後、検量線の間隔や直線性、コントロール試料の検出 Ct 値および定量値を記録し、管理図等でデータを管理していくことも精緻な内部精度管理になると考えられます。(松下) (吉本)

参考資料

- ・「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」J CCLS 版, 2021 年 6 月, 67 ページ,

各論 1 : 「新型コロナウイルス検査」

最重要 A

q1) 検体種や検体前処理等が違うのに、Ct 値で比較評価して良いのですか。Ct 値 40 は判定基準となるのですか。

a1) 各種検査手法における検体種間の一致率評価については下記資料を参照してください。

①厚生労働省科学研究班 (北大 : 豊嶋班) の「無症状者の唾液を用いた PCR 検査等について」

②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：「新型コロナウイルス感染症の診断における鼻かみ鼻汁及び唾液の有用性の検討」

検査手法が異なる方法間では、A48 の理由から、Ct 値のみで製品の性能を評価することはできません。

理論上、検査系に対象遺伝子が 1 コピー含まれていた場合、40 サイクル以内で閾値を超えて検出されることとなりますが、実際には、各検査方法における最小検出感度は 1 コピー超であり、統計学的にも 1 コピーまでの検出は難しいと考えられています。(吉本)

q2) N1 だけまたは N2 だけ立ち上がった時の解釈はどうしたら良いですか。

a2) 各社試薬の添付文書、および各施設での陽性判断の基準に従い、判定および再検査を実施します。各施設での陽性判断の基準の一例として、PCR の 2 領域のうち一方のみ立ち上がった場合には、再検査を 2 重測定で実施し、最初の検査と合わせて合計 3 回の結果について、2 領域の一方のみの立ち上がりでも陽性とみなして数え、合計 3 回のうちで陰性または陽性で多い方の結果を、最終の結果として採用している施設もあります。なお、PCR の 2 領域のうち一方のみの立ち上がりにもかかわらず、Ct 値が小さい場合には、増幅産物のコンタミネーションによる偽陽性の可能性を検証する必要があります。検証した結果、増幅産物のコンタミネーションではない場合には、立ち上がりが見られない方のプライマーまたはプローブ認識配列への変異の可能性が考えられます。(吉本) (丸瀬)

重要 B

q3) PCR 検査と抗原検査をどのように使い分けていますか。

a3) 以下のような特徴に基づいて使い分けます。

【PCR 検査と抗原検査の特徴】

抗原検査は主に免疫クロマトグラフィー (Immunochromatography : IC) 技術を用いた抗原定性検査と化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) と電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) などを原理に用いた抗原定量検査に分かれます。IC 法は特別な装置を必要としない、短時間で結果が得られる、検査場所の制限が少ないなどの長所がありますが、PCR 検査や抗原定量検査よりも感度が低いことから、結果の解釈には注意が必要です。また、検体抽出の操作が不十分な場合、結果に影響を及ぼす可能性があるため、操作上の注意点として検体採取用綿棒の綿球を処理液内で十分に揉み解すこと、処理液から取り出す際には綿球から液をしぼり出すことなどが注意点とされています¹⁾。抗原定量検査は PCR 検査と同等で実用的な検査法ですが、測定対象とする物質が PCR 検査とは異なることから、検査実施のタイミングなどによっては双方の結果に乖離が生じることを認識しておく必要があります。

【PCR 検査および抗原検査の使い分け】

下表に検査法ごとに使用できる検体および検査対象者を示します。

➤ **発症から 9 日目以内**

PCR 検査、抗原定量検査では検体として鼻咽頭、鼻腔、唾液が適用されます。抗原定性検査では鼻咽頭、鼻腔が適用、唾液では薬事承認を得た製品のみ適用されます。

➤ **発症から 10 日目以降**

ウイルス量が減少し検出性能が低くなることから PCR 検査、抗原定量検査とも唾液には推奨されません。抗原定性検査は鼻咽頭、鼻腔での使用が可能ですが、結果が陰性の場合には必要に応じて PCR 検査か抗原定量検査の追加が推奨されます。唾液については適用されません。

➤ **無症状者**

PCR 検査では鼻咽頭、鼻腔、唾液に適用されます。抗原定量検査では鼻咽頭、唾液に適用されます。鼻腔については確定診断としての使用は推奨されませんが、感染拡大地域の医療機関や高齢者施設等において幅広く検査を実施する際にスクリーニングに使用することは可能としています。ただし、結果が陰性の場合でも感染予防策を継続すること、また、結果が陽性の場合であって医師が必要と認めれば核酸検出検査や抗原定量検査により確認することが必要です。抗原定性検査は、鼻咽頭、鼻腔を用いての確定診断としての使用は推奨されませんが、感染拡大地域の医療機関や高齢者施設などにおいて幅広く検査を実施する際のスクリーニング検査として鼻咽頭、鼻腔を使用することが可能とされています。ただし、結果が陽性の場合であって医師が必要と認めれば核酸増幅検査や抗原定量検査による確認が必要となります。唾液については適用されません。

表 1. 検査法ごとに使用できる検体および検査対象者

新型コロナウイルス感染症にかかる各種検査										
検査の対象者		核酸検出検査			抗原検査(定量)			抗原検査(定性)		
		鼻咽頭	鼻腔	唾液	鼻咽頭	鼻腔 ^{※2}	唾液	鼻咽頭	鼻腔	唾液
有症状者 (症状消退者含む)	発症から 9日目以内	○	○	○	○	○	○	○	○	○ (※3)
	発症から 10日目以降	○	○	— (※5)	○	○	— (※5)	△ (※4)	△ (※4)	— (※5)
無症状者		○	○	○	○	— (※6)	○	— (※6)	— (※6)	— (※5)
想定される主な活用場面		<ul style="list-style-type: none"> 検査機器等の配備を要するものの、無症状者に活用できるため、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所等の検査専門施設や医療機関を中心に実施。 大量の検体を一度に処理できる機器や操作が簡便な機器など幅広い製品があるため、状況に応じた活用が重要。 			<ul style="list-style-type: none"> 検査機器等の配備を要するものの、現在供給されている検査機器は、新型コロナウイルス感染症にかかる検査以外にも、通常診療で実施される様々な検査に活用できるため、検査センターや一定規模以上の病院等において活用。 検査法によっては、無症状者に対する唾液を用いた検査を空港検疫等で活用。 			<ul style="list-style-type: none"> 目視による判定または小型の検査機器を用いて、その場で簡便かつ迅速に検査結果が判明する。 現状では対象者は発症初日から9日目の有症状者の確定診断に用いられるため、インフルエンザ流行期等における発熱患者等への検査に有効。 		

※1：本表では行政検査を実施するにあたって推奨される事項をとりまとめている。

※2：引き続き検討が必要であるものの、有用な検体である。

※3：唾液検体での薬事承認を得た製品に適用される点に留意。

※4：使用可能だが、陰性の場合は臨床像から必要に応じて核酸検出検査や抗原定量検査を行うことが推奨される。(△)

※5：推奨されない。(—)

※6：確定診断としての使用は推奨されないが、感染拡大地域の医療機関や高齢者施設等において幅広く検査を実施する際にスクリーニングに使用することは可能。ただし、結果が陰性の場合でも感染予防策を継続すること、また、結果が陽性の場合であって医師が必要と認めれば核酸検出検査や抗原定量検査により確認すること。感染拡大地域の医療機関や高齢者施設等以外の有病率が低い場合には、スクリーニングの陽性的中率が低下することに留意が必要である。なお、スクリーニングとは、主に診断目的ではなく感染リスクを下げる目的で実施するものである。

インフルエンザ等の他疾患との鑑別が必要な場合

インフルエンザの流行期には可及的に季節性インフルエンザと COVID-19 の両方の検査を行うことが推奨されています(表2)。また、重症化の兆候があり緊急性を要すると考えられる患者においては、SARS-CoV-2 を含めたウイルス及び細菌などの急性呼吸器感染症の原因となる病原体に対して多項目遺伝子関連検査を行うことで早期診断および最適な早期治療が可能となります¹⁾。

表 2. 想定される検体と検査の種類等の例

採取する検体	季節性 インフルエンザ	COVID-19	感染防護
① 鼻咽頭ぬぐい液・ 鼻腔ぬぐい液	抗原定性 鼻咽頭ぬぐい液・ 鼻腔ぬぐい液	抗原定性* 抗原定量 核酸検出検査 鼻咽頭ぬぐい液・ 鼻腔ぬぐい液	医療者に一定の曝露あり（フェ イスガード、サージカルマスク、 手袋・ガウン等） ※鼻腔ぬぐい液を自己採取する 場合、医療者の曝露は限定的 （サージカルマスク、手袋）
② 鼻かみ液・唾液	抗原定性 鼻かみ液	抗原定性* 抗原定量 核酸検出検査 唾液	医療者の曝露は限定的 （サージカルマスク、手袋）

*：COVID-19に対する抗原定性検査は、場所を選ばず実施可能であり、短時間で結果を確認することができる。

（第40回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会予防接種基本方針部会・第46回厚生科学審議会感染症部会（令和2年9月10日）の資料「次のインフルエンザ流行に備えた体制整備」より改変 https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_13511.html）

出典

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針 第5.1版. 国立感染症研究所、国立国際医療研究センター、全国保険所長会、地方衛生研究所全国協議会、日本感染症学会、日本環境感染学会、日本臨床衛生検査技師会、日本臨床検査医学会、日本臨床病原体学会、厚生労働省健康局結核感染症課. 2022年3月17日.

参照

1) 日本感染症学会. 「多項目遺伝子関連検査の実施指針」.

(飯田)

q4) 変異株を同定検出する意義は何ですか。また、NGS全ゲノム解析が必要ですか。

a4) 変異株は重症化率が高いという知見および臨床経験や免疫逃避が示唆されるという報告があるものの、変異株が多数を占めつつある現在の流行状況を鑑みると、リアルタイムに変異株に対する検査を行うのは行政レベルにおける疫学調査目的や医療機関における研究・調査目的での変異株スクリーニング検査では必須ですが、臨床に報告する意義は大きくないものと考えられます¹⁾。現在、行政レベルで実施されている変異株スクリーニング検査はSARS-CoV-2 核酸増幅検査にて得られた陽性検体から Spike タンパクのアミノ酸変異を、リアルタイム 1-step RT-PCR 法により同定しますが、変異を本検査で検出できたとしても、

変異株を特定することはできません。ウイルスの塩基配列に生じた変異箇所の特定には、ウイルスゲノムのシーケンス解析が必須となります。

参考資料

- 1) 日本臨床検査医学会 新型コロナウイルスに関するアドホック委員会. 新型コロナウイルス変異株検査に対する考え方. 2021年5月27日.

(飯田)

q5) 変異株が PCR 検査の感度や特異度に与える影響はどのようなものがありますか。

a5) 設計しているプライマーまたはプローブ配列部位に変異が起こらない限り影響はないと思われます。

ただし、変異株によっては、プライマーまたはプローブ配列部位に変異を有する場合があります。アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行の「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」配列を使用しているキットの場合を下記に例として示します。これまでの国内の主な流行株のうち、オミクロン株ではN1-Pプローブ配列内に変異を有します。なお、変異株に対する個別のキットでの影響については、各メーカーから情報発信がなされています。

配列(5'>3')

N1-P プローブ	ACC CCG CAT GTT TGT TGG ACC
アルファ株	ACC CCG CAT GTT TGT TGG ACC
デルタ株	ACC CCG CAT GTT TGT TGG ACC
オミクロン株 (BA.1、BA.2、BA.4)	ACT CCG CAT GTT TGT TGG ACC
オミクロン株 (BA.5)	ACT CCG CAT GTT TGT TGG ACC
	ACT CCG CAT GTT TGT TGG GCC

赤字はプローブ配列と異なる塩基

q6) Ct 値 > 40 の低コピーのウイルスでは、他人へ感染させる可能性は低いですか。

a6) 日本感染症学会：COVID-19 検査法および結果の考え方（2020年10月12日）でCOVID-19 発症後の日数とウイルス遺伝子数（Ct 値）の関連が示されており、報告結果では遺伝子検査陽性が必ずしも感染性ありとはならない可能性が示唆されています。一方で、プライマー&プローブの認識配列に変異を有する変異株を測定する場合にも、増幅が遅延する場合があります。臨床症状から新型コロナウイルスの感染が疑われる場合は、各社が提供する変異株の調査情報を確認するか、不明な場合は各社へお問い合わせください。変異株による増幅への影響が疑われる場合には、変異検査の実施が有効です。（吉本）

参考資料

- ・ <https://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_kensakekka_201012.pdf>

施設における症例の経験（2022.11 追記）

富山大学病院においても流行期後半あたりから既感染者の増加に伴って Ct 値が高い（≒検体中のウイルス量が少ない）PCR 陽性のケースが散見されるようになった。逆に、既感染の患者で Ct 値が低い（≒検体中のウイルス量が多い）ケースも経験している。富山大学病院では前者は感染性は無いものとして対応をし、後者は再感染の疑いとして対応している。また千葉大学病院においても臓器移植術後の免疫抑制剤を使用している患者で SARS-CoV-2 感染の遷延症例を経験している。実際に感染力を持つのか否かは、厳密には Vero 細胞などを用いたウイルス培養や国立感染症研究所などの BSL3 の実験施設でのマウスを用いた実験などで証明する必要がある。おおよそのウイルス量を把握する上で Ct 値が参考となることがある。各施設で可能な範囲で、Ct 値、既往歴、臨床症状等を参考に総合的な判断が望まれる。最近では国際的には SARS-CoV-2 検査の標準化に The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) が用いられている。国内でも SARS-CoV-2 の外部精度管理調査や標準化に一部の自治体では NIBSC の導入が検討されている。NIBSC では Ct 値やコピー数ではなく、IU/mL 単位を使用する。そのための標準物質も入手可能である。（松永・松下）

その他 C

q7) 時間外の新型コロナウイルス検査をどのようにしていますか。

a7) 新型コロナウイルス検査には核酸検査、抗原検査（定量・定性）、抗体検査がありますが、随時（時間外も含めて）核酸検査を行う施設は数少ないのが現状です。時間外に抗原検査（定量・定性）を行った場合、新型コロナウイルス感染症を強く疑うときは、後日核酸検査を行うことを勧めます。

多くの病院検査室では、核酸検査と抗原検査で複数の測定系を準備し、検体も鼻咽頭ぬぐい液・唾液・鼻腔ぬぐい液を使い分けて、対象者の COVID-19 の検査前確率に応じてフローチャートを設けて検査を行っていると考えられます。その際の精度保証も含めて、自施設の状態に応じた体制作りが必須です。

参考資料

- ・2020 年度全国検査部長・技師長会議 アンケート調査結果について。一般社団法人日本臨床検査医学会 村上正巳, 山田俊幸, 今福裕司. 2020, <<https://www.jslm.org/about/zenkoku/20200828.pdf>>
- ・令和 2 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）総括研究報告書 検体検査の精度の確保等に関する研究 研究代表者 矢富 裕, <<https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/148878>>
- ・令和 2 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）「検体検査の精度の確保等に関する研究」（研究代表者 矢富 裕）。分担研究報告 新型コロナウイルス検査の実施施設における精度管理に関するアンケート調査 研究協力者 東田

修二 202022035A-buntan14.pdf.

<<https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyou/hojokin-koubo-2020/gaiyo/19.html>>

- ・令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）「検体検査の精度の確保等に関する研究」（研究代表者 矢富 裕）. 分担研究報告 全国検査部長・技師長会議における COVID-19 関連検査のアンケート調査の結果と分析 分担研究者 村上正巳 202022035A-buntan15.pdf.

<<https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyou/hojokin-koubo-2020/gaiyo/19.html>>

- ・新型コロナウイルス感染症検査の使い分けの考え方 一般社団法人日本臨床検査医学会 新型コロナウイルスに関するアドホック委員会,

<<https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20210127-1.pdf>>

- ・新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針 第4版,

<<https://www.mhlw.go.jp/content/000790468.pdf>>

（平井）

q8) COVID-19 のスクリーニングとしての無症状者への SARS CoV-2 核酸検査はどのように考えれば良いでしょうか。

a8) COVID-19 のスクリーニングを目的とした一般集団（無症状者を含む）を対象としたモニタリング検査としての PCR 検査数の指標については具体的なものはありません。2020年初頭より、PCR 検査の感度が70%という数字が独り歩きしており、無症状者の偽陽性や陽性者の対応（入院や宿泊施設あるいは自宅療養）の負担から、わが国では PCR 検査数を抑制する方針がとられて現在に至っています。

参考資料

- ・ <<https://ourworldindata.org/coronavirus-testing>>

総論（Q1、Q2）に記載したように感度には検査感度と診断感度があり、区別して議論する必要があります。無症状者へのスクリーニング検査については、検査前確率が低いことから、その有効性については様々な議論が続いています。

2021年8月は1週間平均で PCR 検査の陽性割合は東京都の報告では20%超が続いています。このことから、有症状者のみではなく、無症状者を含めた COVID-19 のスクリーニングを目的とした PCR 検査等の核酸増幅検査、抗原検査の実施数については以下のような視点もあります。

PCR 検査陽性者のうち無症状の感染者の割合を考慮した検査数

PCR 検査実施者の陽性者の割合を考慮した検査数

例えば、PCR 検査陽性者のうち無症状の感染者の割合が1割程度であれば、無症状者の割

合が3割程度となるまで PCR 検査数を増やして感染者の地域的な分布を明らかにする、という考えです。同様に、PCR 検査実施者の陽性者の割合が20%を超える場合には、5~10%程度となるまで検査数を増やす必要があるのではないのでしょうか。限られた医療資源を有効に使用するためには、検査前確率が低い中で核酸検査数を増やすよりも、COVID-19 患者の医療介入への対応を優先させた方が良いという考え方もあります。2020 年に入り、国内では COVID-19 感染症に対するワクチン接種が開始されています。今後はゼロコロナを目指すのではなく、ワクチン接種を進めながらのいわゆるウィズコロナの時代になると言われています。ワクチン接種と無症状者への SARS-CoV-2 核酸検査の有効性のバランスについて、費用対効果も含めて継続的に考える必要があります。そのためにも COVID-19 感染症検査の基本となる SARS-CoV-2 核酸検査の標準化が重要と考えられます。(松下)

教科書レベル

q9) PCR は DNA を増やす技術と聞いています。新型コロナウイルスは RNA ウィルスのはずですが、何故 PCR で測定ができるのですか。

a9) RNA をゲノムに持つインフルエンザウイルスや HIV もそうですが、そのままでは PCR では反応しません。PCR というのは、DNA は増やせますが、RNA を増やすことはできないからです。RNA を検出したい場合は、RNA を逆転写反応により一旦 DNA に変え、PCR を行うことで間接的に RNA の存在が判定できます。また核酸の安定性からいっても、DNA の方が扱いやすいです (RNA は不安定で、壊れやすい)。

これより、まずコロナウイルスの RNA を逆転写反応により相補的な cDNA を合成します (DNA ができたので PCR を行えます)。このコロナウイルス由来の cDNA をテンプレートに、PCR 反応を行えば、ウイルスがいると cDNA が合成されるので、PCR 反応で増幅されます (陽性)。ウイルスがいないと、cDNA が合成されないので、PCR 反応で増幅されません (陰性)。RNA を検出する場合は、一旦 DNA にしなければ検出できないのがポイントになります。

関連するトピックス

1. 変異株の NGS による検査 (石毛)

新型コロナウイルスの変異検査として、リアルタイム PCR や塩基配列解析が用いられています。リアルタイム PCR は簡単な方法であり、既知の特定の変異 (例えば、S 遺伝子の N501Y など) を調べる場合に有効です。未知の変異やより広範囲の遺伝子変異を調べる場合には塩基配列解析が必要です。塩基配列解析としてはサンガー法や次世代シーケンシング (NGS 法) が行われます。NGS を用いた新型コロナウイルスの全ゲノム解析のプロトコールの詳細は ARTIC NETWORK (<https://artic.network/ncov-2019>) により紹介されています。ARTIC の方法では約 30 kb の新型コロナウイルスゲノムを 98 対のプライマーを用いて増幅する multiplex tiling PCR が用いられています。解析されたデータを参照配列 (NC_45512) と比較することにより、どのような変異があるか、どの系統であるかを調べます。世界中でゲノム解析によるサーベイランスが行われており、その結果は公共のデータベースである GISAID (Global initiative on sharing all influenza data) に登録されています (登録は任意)。登録日と系統より、その地域で流行している株を知ることができます (サンプリングバイアスなどにより真の頻度ではありません)。例えば、日本では、2021 年の 4~7 月頃はアルファ株が、それ以降はデルタ株が流行しています。

2. 検査部・検査室の現場スタッフ (初心者) へのトレーニングの実際

(平井、松永、池尻、石毛)

【トレーニングに際して留意した点】 (千葉大学の例)

[新型コロナウイルスの基礎知識]

- 検査者自身の感染防護
- 検査材料として呼吸器材料が提出されること (喀痰などの場合には前処理が必要)
- RNA ウィルスであるため RT-PCR により検出すること
- 核酸の性質として RNA は分解しやすいこと

[ピペット操作]

- 微量の検体・試薬 (酵素溶液などは粘性が高い) の取り扱い
- コンタミネーション防止のためのフィルターチップの使用

[機材の適切な使用方法]

- 安全キャビネットでの検体処理
- クリーンベンチでの試薬調製
- サーマルサイクラー・リアルタイム PCR 装置の使い方

[結果の解析]

- 結果の判定方法 (増幅曲線の見方)
- 内部精度管理 (内部標準遺伝子の増幅確認、陽性/陰性コントロールの確認)

【スタッフへのトレーニングの実際】（浜松医大の例）

まずは PPE の着脱について感染対策の重要性も含めて説明し、習得してもらいます。次に検体の種類（鼻咽頭か唾液）と検査の種類（抗原定性、抗原定量、PCR）を説明し、検体を受け取るときの確認するポイント（鼻咽頭ならウイルス輸送液にスワブが入っているか、唾液なら量が足りているか、オーダーは正しいかなど）を伝えます。

実際の検査手技は SOP（添付文書やプロトコール）にそって説明します。検査を行う上で特に重要な安全キャビネットとクリーンベンチの違いやコンタミネーションを防止するためのピペット操作や検体の取り扱い方法と手指消毒の重要性について理解してもらいます。

検査原理と検査結果の見方（コントロールが正しく増幅または増幅していないか）と判定基準について説明し、最終的には検査を検体受け取りから結果送信まで一人で行えるようになってもらいます。

以下のものはレクチャーする内容を箇条書きにしたものです。

〔検査前〕

- PPE の着脱方法（感染対策の重要性）
- 検体の種類（鼻咽頭か唾液か）
- 検査の種類（抗原定性、抗原定量、PCR）
- 検体受け取りの確認ポイント（鼻咽頭ならウイルス輸送液にスワブが入っているか、唾液なら量が足りているか、オーダーは正しいかなど）

〔検査〕

- SOP（添付文書やプロトコール）にそった検査手技
- 安全キャビネットとクリーンベンチの違い
- コンタミネーションを防止するためのピペット操作や検体の取り扱い方法と手指消毒の重要性
- 検査原理と検査結果の見方（コントロールが正しく増幅または増幅していないか）と判定基準

〔検査後〕

- 試薬保管の温度や検体保存
- コンタミネーション防止のための汚染除去方法

【初心者へのトレーニングの実際】（富山大学の例）

当院検査部で初心者の方へ説明した際のポイントを下記にまとめました。

〔新型コロナウイルスの基礎知識〕

- SARS-CoV-2 は RNA ウィルスであること
- 本検査では SARS-CoV-2 の N 遺伝子の 2 領域（N1、N2）をターゲットに増幅を行うこと

〔原理〕

- 試薬キットの内容（プライマー、蛍光標識プローブ、dNTP、DNA ポリメラーゼ、逆転

写酵素 等) とそれぞれの役割について

- プロトコールについて (逆転写、熱変性、アニーリング、伸長反応、蛍光測定)
- リアルタイム PCR について (蛍光標識プローブを用いて増幅曲線を検出)
- RT-PCR について (標的 RNA に相補的な cDNA を合成し、それを鋳型として PCR を行うこと)

[検査前]

- PPE の装着 (検査者の感染防止)
- 作業ごと (前処理、試薬調整、試薬と核酸の混合) のエリア分け (安全キャビネット、クリーンベンチ)
- それぞれのエリア専用のピペット、チップを用いること (コンタミネーション防止)
- 検査前後の安全キャビネット、クリーンベンチ、器具等の清掃

[検査]

- 検査手順 (検体受付から結果報告までの流れ)
- ラベルと検体種 (鼻咽頭拭い液) の確認

[結果の解析]

- 結果の判定方法 (増幅曲線の立ち上がりの確認)
- 内部標準コントロール、陽性/陰性コントロールによる内部精度管理
- 増幅曲線の立ち上がりサイクル数とウイルス量の関係 (ウイルス量が多いほど、早期に増幅曲線が立ち上がる)

[手技]

- ピペットの扱い方
- PCR 検査におけるコンタミネーション防止の重要性
- コンタミネーション防止のための手技について (手袋やチップを交換するタイミング、PCR チューブ等の蓋の内側を触らないこと、蓋が開いている PCR チューブの上で手やチップを通過させないこと、フィルター付きチップの使用 等)
- 操作を氷上で行うこと (RNA 分解防止)

3. 不顕性感染者の下水による検査 (小林)

COVID-19 感染の現行の臨床検査には、PCR 検査能力拡充の限界、無症状感染者の把握困難、陽性者に対する差別や偏見、感染から報告までに時間を要することなど、数多くの課題が散見されます。一方で、下水中に含まれる SARS-CoV-2 を分析する「下水疫学調査」は、発症者/無発症者にかかわらず、生活排水である下水中に SARS-CoV-2 が集積することを利用して一度の検査で集団レベルでの感染流行状況の把握が可能であり、上記複数の課題を同時に克服する画期的な早期検知・大量検査法となり得る可能性が示唆され、COVID-19 の世界的感染拡大により国内外で下水疫学調査が一挙に社会の注目を集めることとなりました。

【下水疫学調査】

下水疫学調査は、下水処理区域内に存在するあらゆる病原性病原体（SARS-CoV-2 などウイルスを含む）の痕跡を、感染者のうがいや排泄物などが下水処理場に集積するという下水道インフラの特性を活用して測定する調査です。下水中の SARS-CoV-2 など病原病原体を定期的に分析することで、特定の地域や建物における目的の病原病原体の侵入、流行状況、分子疫学および流行収束を把握できる可能性があります。

【下水中の SARS-CoV-2 の検出技術の高度化】

日本は欧米と比較して感染者数が少ないために、従来の手法では下水中から SARS-CoV-2 RNA の定性的な検出ができて、定量的なレベルでの測定、経時モニタリングが不可能でした。最近、アカデミアのみならず、複数の企業が産学連携にて下水中の SARS-CoV-2 RNA の検出技術の高度化とその技術を用いた実証調査を実施しています。具体的には、下水中 SARS-CoV-2 RNA の高感度検出技術の開発、自動解析体制の構築、変異株の検出、複数自治体におけるモニタリング調査などに取り組んでいます。実際に 2012 年 7 月、国土交通省 水管理・国土保全局下水道部より複数の自治体にて採水し、同高感度技術を用いて測定された下水の SARS-CoV-2 RNA 濃度が公表されました。今後、新型コロナウイルス感染症対策の基本的対処方針に基づき、下水疫学調査を加速することが示されています。

参考資料

- ・ <https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/mizukokudo_sewerage_tk_000721.html>

【今後の展開】

下水疫学情報は、今後の COVID-19 の感染拡大防止と社会経済活動再開に向けた適切な政策決定のための判断材料の一つとして、また今後の感染流行の実態把握のためのツールとしての活用が期待されます。下水疫学調査は、COVID-19 に加えて将来起こり得る次なるパンデミックの際にも有効である可能性が高く、感染症に対して強靱な未来社会を構築する上で新たに整備すべき重要な社会インフラの一つであり、「感染症流行状況の監視」という新たな役割・価値が付加されることとなります。SARS-CoV-2 との闘いが長期化する中で、感染拡大防止対策の新たなアプローチが求められている今、都市下水や施設排水を対象とした下水疫学調査に関する研究や技術開発の加速と社会実装の早期実現が期待されます。

4. 抗原定量検査と PCR 検査の比較（八木）

現時点で新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の病原体検査として厚労相より承認されている検査法は、核酸増幅検査（PCR 法など）と抗原検査があり、抗原検査は、その感度の違いより、抗原定性検査、抗原定量検査があります。各検査の特徴、その利用に関しては、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の病原体検査の指針（第 5.1 版）にまとめられて

います。検査法の違いにより、推奨される検査対象（有症状者か無症候性）と適用可能な検体種（鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液、下気道分泌液）に違いがあります。詳細は、指針の表3（下表）にあります。

表3 各種検査の特徴^{*1}

新型コロナウイルス感染症にかかる各種検査										
検査の対象者		核酸検出検査			抗原検査（定量）			抗原検査（定性）		
		鼻咽頭	鼻腔	唾液	鼻咽頭	鼻腔 ^{*2}	唾液	鼻咽頭	鼻腔	唾液
有症状者 （症状消退者含む）	発症から 9日目以内	○	○	○	○	○	○	○	○	○ （※3）
	発症から 10日目以降	○	○	— （※5）	○	○	— （※5）	△ （※4）	△ （※4）	— （※5）
無症状者		○	○	○	○	— （※6）	○	— （※6）	— （※6）	— （※5）
想定される主な活用場面		<ul style="list-style-type: none"> 検査機器等の配備を要するものの、無症状者に活用できるため、保健所、地方衛生研究所、国立感染症研究所等の検査専門施設や医療機関を中心に実施。 大量の検体を一度に処理できる機器や操作が簡便な機器など幅広い製品があるため、状況に応じた活用が重要。 			<ul style="list-style-type: none"> 検査機器等の配備を要するものの、現在供給されている検査機器は、新型コロナウイルス感染症にかかる検査以外にも、通常診療で実施される様々な検査に活用できるため、検査センターや一定規模以上の病院等において活用。 検査法によっては、無症状者に対する唾液を用いた検査を空港検疫等で活用。 			<ul style="list-style-type: none"> 目視による判定または小型の検査機器を用いて、その場で簡便かつ迅速に検査結果が判明する。 現状では対象者は発症初日から9日目の有症状者の確定診断に用いられるため、インフルエンザ流行期等における発熱患者等への検査に有効。 		

※1：本表では行政検査を実施するにあたって推奨される事項をとりまとめている。

※2：引き続き検討が必要であるものの、有用な検体である。

※3：唾液検体での薬事承認を得た製品に適用される点に留意。

※4：使用可能だが、陰性の場合は臨床像から必要に応じて核酸検出検査や抗原定量検査を行うことが推奨される。（△）

※5：推奨されない。（—）

※6：確定診断としての使用は推奨されないが、感染拡大地域の医療機関や高齢者施設等において幅広く検査を実施する際にスクリーニングに使用することは可能。ただし、結果が陰性の場合でも感染予防策を継続すること、また、結果が陽性の場合であって医師が必要と認めれば核酸検出検査や抗原定量検査により確認すること。感染拡大地域の医療機関や高齢者施設等以外の有病率が低い場合には、スクリーニングの陽性的中率が低下することに留意が必要である。なお、スクリーニングとは、主に診断目的ではなく感染リスクを下げる目的で実施するものである。

[出典] 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針 第5.1版。国立感染症研究所、国立国際医療研究センター、全国保険所長会、地方衛生研究所全国協議会、日本感染症学会、日本環境感染学会、日本臨床衛生検査技師会、日本臨床検査医学会、日本臨床病原体学会、厚生労働省健康局結核感染症課。2022年3月17日。

抗原定量検査は、核酸増幅検査と同等の臨床精度（感度、特異度）があり、そのため核酸増幅法と同じ目的での使用が可能とされています。抗原定量検査は、核酸検査と異なる物質を、異なる原理で検出、測定しているため、核酸検査と異なる注意が必要です。注意事項は、添付文書に記載されていますが、補足情報として、各メーカーから、個別のキットに関して

の情報発信がなされています。本稿ではなるべく個別のキットの課題に言及することはせず、共通と考えられる項目について記載しているため、各メーカーから提供されている情報を巻末に付記したので参照してください。

抗原定量検査の感度と RT-PCR 法との感度の違いは核酸増幅法で最も感度が高いとされる RT-PCR 法と同等とされていますが、その絶対分析感度は低いです。承認品の添付文書からは、100~400 コピー/反応の検体における陽性一致率が RT-PCR と同等であることが示されており、標準法である感染研法に従った場合、概ね Ct 値が 32 以下であれば検出可能と考えられます。Ct 値 32~35 はキットによっては判定保留に相当します。Ct 値 35 以上でも検出される例は多く報告されており、臨床症状等から考えても陽性と判断される例もあります。なお各論（分析後プロセス）の Q47、48、q1 にあるように標準化されておらず、キット、試薬によって異なっており、また検体、RNA の標準化もなされていないことに留意が必要です。

【PCR 検査の Ct 値と抗原定量値との相関】

ゲノム RNA (gRNA)、抗原定量検査で測定しているヌcleoキャプシドタンパク質 (NP)、いずれも、Virion に含まれており、生物学的には、その比は一定 (gRNA : NP = 1 : 400~500) (文献に基づく推定値) と考えられます。gRNA コピー数と NP 量の間には正の相関があると考えられ、実際に正の相関が報告されています (Ct 値とは負の相関)。しかし gRNA : NP 比は検体によっては大きく異なっており、理論比よりも NP 比が高い場合が多いです。一方、感染後期の検体などでは、NP の比が低くなる傾向が認められます。PCR の原理から、RNA コピー数が低くなるほど定量性が低くなることなど定量性の問題が原因の一つとして考えられます。gRNA、NP いずれも、Virion 以外に、感染細胞の Necrosis で生じ、放出されるもの、他のコロナウイルスで観察されている不完全粒子、コロナウイルスの複製の際に産生される sgRNA (subgenomic RNA)、さらに検体中での gRNA と NP の安定性の違いなどが、差を生じさせる要因として考えられますが、今後ウイルス学的な解析が進むことによって明確になってくることが期待されます。

【抗原定量値の標準化】

キット間で異なる標準物質を用いており、それぞれの標準物質の値の関連に関する報告はありません。国際標準品に関しても検討が進められているようですが、何を標準品として用いるかについては、前述のようにウイルス学的に不明な点が多々あること、抗原定量検査に用いるモノクローナル抗体によっては、NP の構造によって反応性が異なる場合が考えられること、ウイルスが変異を繰り返す中でどの株由来の材料を用いるのかなど、課題が多く、標準化は容易ではないことが想定されます。

【抗原定量検査を行う上で注意すべきことは何ですか？】

➤ 精度管理の重要性

抗原定量検査は、メーカーの推奨する方法により精度管理された測定機器を用いた場合にその性能が保証されていることから、メーカーの推奨する頻度、方法で測定機器のメンテナンス、精度確認を行う必要があります。

➤ **抗原定量検査を行うことができる検体種の違いは？**

唾液検体が測定可能なキットは1種類のみである（2021年8月11日時点）ことに留意しましょう。ただし、検査キットの改良に伴い、適用可能な検体種が変更される場合があるので、メーカーからの案内、メーカーへの問い合わせで確認するとともに、常に最新の添付文書と適用ロットの確認を行う必要があります。

➤ **PCRでは検出されるが抗原検査で検出されない例としては？**

感染後期の重症化例などでは、上気道（鼻咽頭、鼻腔、唾液）ではウイルスが検出されず、下気道分泌液、血液、排泄物などからのみ検出されることが報告されています。またブルターニュ株として報告された臨床例では、鼻咽頭ぬぐい液では陰性であったものの、下気道検体では陽性であったことが報告されています。下気道分泌検体は、抗原定性検査の臨床検体として承認されていないため、抗原定量検査の添付文書に従った方法では検出ができないこととなります。ただし、原理的に抗原が検出できないことにはならないので、適当な希釈を行うことによって検出可能となることが想定されますが、メーカーの保証する範囲ではないので間違った判定となる可能性があります。

➤ **検体の前処理**

抗原定量検査キットにより、測定前の前処理方法が異なります。また複数の前処理が可能であるキットもあるため、メーカーの添付文書に記載されている方法に従うことが重要です。

➤ **抗原定量試薬間での前処理方法の互換性**

抗原定量検査は、メーカーの推奨する前処理剤、前処理方法だけを用いることが重要です。施設検討の結果、キット間で前処理剤が使用可能と判断され、利用される可能性があります。メーカーはその使用を保証していない場合には、間違った判定結果となる場合があります。そのため推奨されません。ただし、検査キットメーカーが検証し添付文書を改訂し利用可能となる場合も想定されるため、添付文書の改訂やメーカー案内を随時確認することが重要です。

➤ **核酸検査用保存液、ウイルス不活化液などの前処理剤との互換性**

核酸検査用の保存液、ウイルス不活化液などは、グアニジン塩やタンパク分解酵素、抗原抗体反応を阻害する界面活性剤、塩、有機溶媒等が含まれることが多いため、抗原定量検査の原理であるイムノアッセイを阻害する可能性が高く、用いることができないと考えられます。メーカーによっては、具体例を含めて注意喚起されているので、メーカーの準備した案内などを確認することが重要です。

逆に、抗原検査用の前処理剤によって処理した検体を核酸検査に用いることも推奨されません。抗原検査用の前処理剤は、ウイルス粒子の膜構造を破壊し、ヌクレオキャプシドタンパク質を露出や遊離させるため、遊離したRNAは容易に分解される可能性があります。そのため、抗原検査用の前処理剤によって処理した検体を用いた核酸増幅検査は間違った判定

となる可能性があり推奨されません。

➤ 抗原陽性 PCR 陰性判定不一致について

抗原定量検査の臨床研究は、核酸検査による判定を正値とした判定で評価されてきているため、間違っただ判定の場合、抗原定量検査結果が間違っていると評価されてきました。しかし臨床現場では、核酸検査においても間違っただ判定となる場合があるため、確定診断においては、臨床症状に基づく判断が重要となります。しかし、これまでに臨床症状を加味した上で、明らかな抗原定量検査の偽陽性と判断される例も報告され、間違っただ検体の取り扱いに起因することもあり、添付文書、メーカーの提供する情報などを確認し、間違っただ判定につながるないように留意することが重要です。検体種が異なっただ比較、同じ検体種でも核酸判定と抗原検査が異なっただサンプリング検体を用いている場合、検体採取法の違いによる判定不一致が起こる可能性があります。あらゆる検査法には、間違っただ判定になるリスクがあるため、臨床データをもとにした診断が重要です。抗原定量検査において、検体の前処理による判定不一致が報告されています。キットメーカーの提供する情報を確認し、適切な前処理を行うことが求められます。

➤ 核酸検査陽性・抗原検査陰性の判定不一致について

前述のように、抗原定性検査は PCR 法と比較した場合、絶対分析感度は低いです。そのため、原理的に核酸検査陽性・抗原検査陰性判定は抗原定量検査の LOD 以下で起こることは避け得ません。しかし、以下のような理由から、核酸検査陽性・抗原検査陰性の判定不一致は、臨床上大きな問題ではなく、その特性を理解した上での運用が重要と考えられます。感染性ウイルスは発症後期間とウイルス量に依存することが知られています。感染性ウイルス発症後 9 日、ウイルス量として Ct 値 34 以上ではほとんど検出されません。すなわち抗原定量検査、PCR 検査との陽性一致率は、ウイルス量に依存するとともに、発症後日数に大きく依存します。COVID-19 の第一波の頃には、感染後、臨床症状は寛解したにもかかわらず、PCR 法で持続的にウイルスが検出され、病床逼迫の観点から、持続的な PCR 検査陽性は退院基準の問題となっていました。現在では発症後 9 日経ち、臨床症状が寛解していれば、検査を行うことなく退院させることが可能となっています。これらのことを考え合わせると、COVID-19 患者において、発症後日数、臨床症状を考え合わせた判断は必要となります。一方、核酸検査陽性・抗原検査陰性の判定不一致は大きな問題ではないと考えられます。一方、無症候性感染者、発症前の感染者に関するエビデンスは十分とは言えないため、濃厚接触者の検査において、核酸検査陽性・抗原検査陰性の判定不一致が起こる可能性を否定できないことに留意すべきと考えます。しかし、別項の検疫での例を考えると、感度の違いによることだけではない要因の大きさにも、十分に留意すべきだと考えます。

各社から提供されたキットごとの注意事項

【ルミパルス®・ルミパルスプレスト®SARS-CoV-2 Ag:富士レビオ株式会社提供情報】

➤ 抗原検査の判定保留とは？

キットにより判定保留域が設定されていますが、これは臨床研究によって示されたカット

オフ値で陽性判定を行った場合に、抗原定量法陽性/RT-PCR 法陰性という判定不一致が認められたことにより設定されました。感染研法による RT-PCR との相関から、判定保留域は、おおよそ RT-PCR 法の Ct 値 32~35 に相当します。測定値が判定保留域にあるときには、再検査を推奨しています。

➤ **判定保留にあった場合にはどのようにするのが好ましいか**

判定保留域の課題は、PPV (Positive predictive value) であるため、統計学的に、事前陽性確率により判定一致率は大きく変化します。感染が蔓延していない地域での有症候者を対象とした検査や、陰性がほとんどであると考えられるマスキングなど、事前陽性確率の低い群を対象とする場合には、偽陽性判定につながるリスクが高くなります。

小林ら¹⁾は臨床検体を用いた検討で見いだされた判定不一致例を下に、メーカーの推奨する検体の前処理をさらに厳しくするとともに、独自の判定保留域を設定し、判定保留域にある検体の RT-PCR 法での確認を推奨しています。

横田ら²⁾は、抗原定量検査と RT-PCR 法を組み合わせた、空港検疫での唾液検体を用いたマスキング法を提唱し、空港検疫では、この方法を下に、独自のスクリーニング法が適用されています。また東京オリンピック・パラリンピックでも同様のプロトコールが導入されていました (アスリート・チーム役員公式プレイブック: 2021 年 6 月、第 3 版)³⁾。

これらのことから、事前陽性確率が低い群を対象とする場合は、TAT に優れた抗原定量検査を一次スクリーニングに用い、判定保留域に対しては、抗原定量検査での再検査、RT-PCR による二次検査などを組み合わせるのが有効であると考えられます。

➤ **検体の前処理について**

検体の前処理、例えば唾液の PBS や検体希釈液による希釈混合が不十分な場合、鼻咽頭ぬぐい液や希釈後の唾液検体の遠心操作が不十分な場合、遠心後に上清を取り分けられない場合、鼻咽頭ぬぐい液を検体処理液で混合、抽出処理が不十分な場合には、粘性による検体吸引エラー、粘性による反応夾雑物の吸引などを起こし、正しい判定が行われない場合があるため、添付文書に従った、正しい前処理を行った検体を用いて測定することが重要です。

➤ **検体採取について**

唾液と鼻咽頭ぬぐい液を用いた臨床研究では、唾液中の抗原量は鼻咽頭ぬぐい液中の抗原量と正の相関を示しましたが、その量比は検体によって異なっていました。また公表された情報ではありませんが、唾液で強陽性 (抗原量が非常に多く PCR 陽性) にもかかわらず、鼻咽頭ぬぐい液で陰性などの例の報告がカスタマーよりあり、抗原定量検査だけの課題ではありませんが、検体採取による判定不一致は起こるリスクがあるため、検体採取は、感染研から発出されている 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 ~2021/03/19 更新版~等を参考に、正しく取り扱うことが重要です。

参考資料

- 1) Kobayashi R, et al. Evaluation of false positives in the SARS-CoV-2 quantitative antigen test. J Infect Chemother 2021 ; doi:10.1016/j.jiac.2021.06.019.
- 2) Yokota I, Shane PY, Teshima T. Logistic advantage of two-step screening strategy for SARS-CoV-2 at airport quarantine. Travel Med Infect Dis 2021 ; 43 : 102127. doi:10.1016/j.tmaid.2021.102127.
- 3) <[https://www.paralympic.org/sites/default/files/2021-06/The%20Playbook%20-%20Athletes%20and%20Officials%20-%20June%202021%20\(JP\).pdf](https://www.paralympic.org/sites/default/files/2021-06/The%20Playbook%20-%20Athletes%20and%20Officials%20-%20June%202021%20(JP).pdf)> (2021/11/15 確認).

【HISCL[®] SARS-CoV-2 Ag 試薬 : シスメックス株式会社提供情報】

抗原定量検査と PCR 検査との不一致要因、偽陰性、偽陽性に関する注意喚起を示します。

➤ 検査法による検体種の違い

当社製品の場合、PCR 検査と抗原検査では採取綿棒や不活化試薬が異なるため、厳密には異なる検体として取り扱うことが重要であると考えます。加えて、検体の採取時期のずれによっては患者の臨床背景を反映し、不一致は一般的に起こりうると考えられるため、判定・診断にあたっては総合的な判断が重要だと考えております。

■ 検体のサンプリングに関する注意

➤ 抗原検査の偽陰性要因 :

適切に検体処理がされていないことが考えられます (例えば、当社 PCR 検査用不活化試薬を使用した場合、タンパク質が分解され偽陰性となることがあります)。

➤ 抗原検査の偽陽性要因例 :

推奨外の綿棒を用いた場合、検体の粘性が高くなり、偽陽性の頻度が増える場合があることが報告されてきております。可能な限り推奨綿棒を使用し、それ以外の綿棒を使用したい場合は、ご施設にて事前に検証いただきますようお願い致します。

➤ PCR の偽陰性による判定不一致

唾液中に含まれる夾雑物の影響による核酸増幅不良や、プライマー&プローブの認識配列に変異を有する変異株の影響、検体保存方法が不適切であったことによる核酸分解に起因する偽陰性などにより PCR 検査の偽陰性が生じ得るため、検体の取り扱いや変異株の影響には十分にご留意ください。

➤ PCR の偽陽性による判定不一致

陽性検体や陽性コントロールの混入、検査環境下からの増幅産物のコンタミネーションなどにより偽陽性反応が生じ、判定不一致になることがあるため、検体の取り扱いに関しては十分にご留意ください。

【エクルーシス[®]試薬 SARS-CoV-2 Ag : ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社提供情報】

本品において特に注意喚起させていただきたいのは、添付文書の【重要な基本的注意】の5にある以下の点となります。

『鼻腔ぬぐい液を検体とした場合、適切な検体採取が行われないと正しい結果が得られない可能性があるため、【操作上の注意】をよく読み、1本のスワブで必ず両鼻腔から採取してください。』

検査の性能を保持するため、鼻腔からの検体採取については、添付文書に記載されている下図のように、必ず両鼻腔からの検体採取をお願い致します。

・鼻腔ぬぐい液

- ① 検体採取用の滅菌スワブ（別売）を用意します。
- ② 滅菌スワブを鼻腔（鼻前庭）約 1～2cm のところまで挿入します。この時無理に圧を加えないでください。
- ③ 鼻腔壁にスワブを約 3 秒間回転させ、粘膜表皮を採取します。滅菌スワブの先端がほかの部位に触れないように鼻腔から注意深く引き出します。
- ④ 同じスワブを使用して反対の鼻腔でも同様の操作を繰り返します。



変異株と抗原検査（抗原定性検査、抗原定量検査）（八木）

オミクロン株の亜系統を含め多くの変異株が報告され、感染拡大を起こしてきました。変異株の分類は、ゲノム全体の変異パターンで行われますが、多くの特徴は感染効率に影響を与える S 抗原などに集中しています。抗原定性検査、抗原定量検査は、いずれもウイルス内部のヌクレオキャプシド蛋白質（NP）を免疫測定で検出するものですが、S 抗原ほど多様ではないものの、株に特徴的な変異が報告されています（図：変異に関しての富士レビオ社からの提供情報）。

【参考】オミクロン株 BA.2 系統の N タンパク質の主要な変異箇所と他変異株との比較

赤字：既に反応性を確認している変異株と共通する変異箇所

変異株	反応性 確認	各株の主要な変異箇所 (Nタンパク質)																			
		D3L	P13L	E31del	R32del	S33del	D63G	P80R	E136D	P151S	R203K	R203M	G204R	T205I	G214C	G215C	S235F	T366I	D377Y	S413R	
オミクロン株 BA.1系統	確認済み		●	●	●	●							●								
オミクロン株 BA.2系統	確認済み		●	●	●	●							●								●
オミクロン株 BA.2.75系統	BA.2と共通		●	●	●	●							●								●
オミクロン株 BA.4系統	確認済み		●	●	●	●				●			●								●
オミクロン株 BA.5系統	確認済み		●	●	●	●			●				●								●
アルファ株	確認済み	●											●								
ベータ株	確認済み													●							
ガンマ株	確認済み									●			●								
デルタ株	確認済み						●						●				●		●	●	●
ラムダ株	確認済み		●										●								●

- * BA.5 系統のメジャー変異は BA.2 系統のメジャー変異と共通ですが、マイナー変異として報告されている E136D 変異は出現頻度が比較的高く、今後 E136D を含む BA.5 系統が主流になる可能性を想定し、E136D を含むコンビナント抗原を作成し、反応性を確認。
- ** デルタ株で見られたマイナー変異である S413I の反応性を確認 (オミクロン株 BA.2、BA.4、BA.5 系統では S413R)

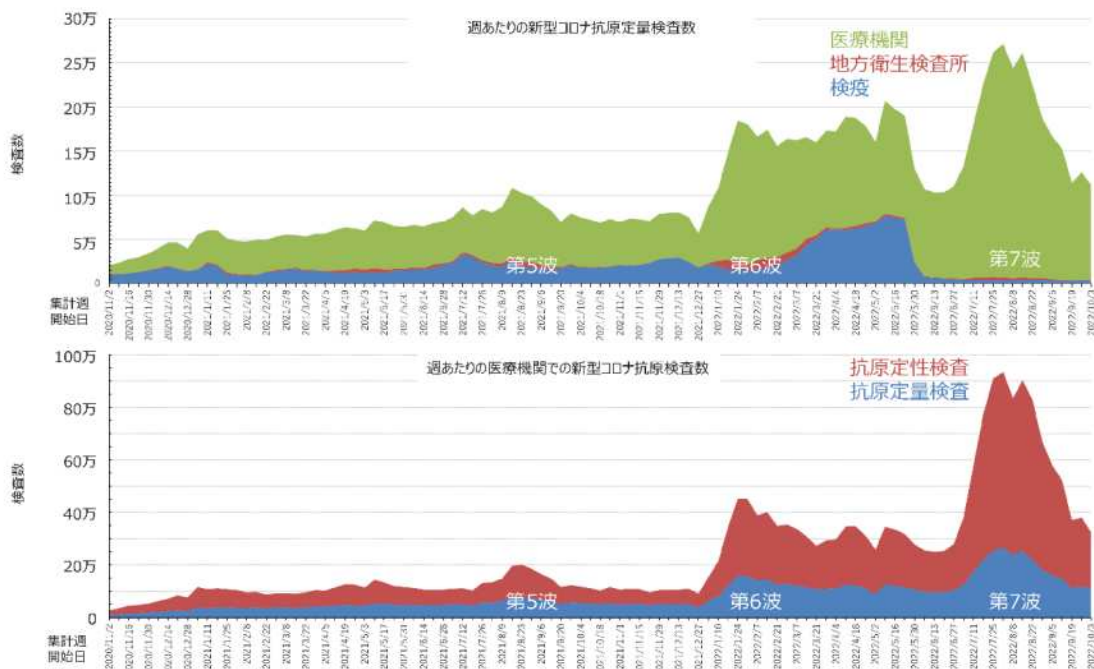
補足：BA.2.75 系統について

BA.2.75 系統は、BA.2 系統、BA.5 系統と比較し、スパイクタンパク質に多数の変異を含み、ワクチン接種による中和抗体からの逃避への影響が示唆されています。国立感染症研究所「新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の変異株 BA.2.75 系統について」<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11276-covid19-ba-2-75.html>

各社用いている抗体等が異なっているため、キットごとに情報の提供が行われており、これまでに変異の影響で判定が異なることはないと言われています。しかし、影響を与える変異が出現しないとは言えないため、今後とも販売元からの情報提供が求められます。

5. 国内の新型コロナウイルス抗原検査 (抗原定性検査、抗原定量検査) の役割の変化 (八木)

第7波の新型コロナウイルス検査においては、各種検査数の増加と共に、医療機関におけ



院内 PCR 検査と抗原定性検査の比率が大きくなっていました。これは、IVD として承認された抗原定性検査キットが多数の会社から供給されるようになったこと（抗原定量、定性検査として 60 品目：令和 4 月 11 月 8 日）、薬局で入手可能となったこと、国・自治体からの配布があり抗原定性検査の認知が上がってきたことなどの要因が考えられます。抗原定量検査も、第 7 波の時には多くの医療機関で活用されていました。

今後は、一定の制限はあるものの、新型コロナウイルス感染症の一般用抗原検査キット（OTC：第一類医薬品）が承認販売されるようになり（https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_27779.html）、セルフテストの結果で医療機関を受診される例が増えてくることが予想されます。OTC の販売、利用に関するガイドラインが出され、販売者には十分な説明を課すと共に、発売元に対して検査法に関する情報提供が求められており、発売元はパンフレット、アプリ、Web site などで情報提供を行っています。しかし、感染症検査において、OTC は初の事であり、発売元、販売者、一般ユーザー、およびその結果として医療行為を提供する医療機関のなかで、様々なケースが生じてくることが予想されるため、各ステークホルダー間での情報共有、議論の重要性が増してくるものと考えます。

6. 核酸検査の精度管理、精度管理物質、コンタミネーション防止（大場・松下）

病原体の核酸検査は、医療法や臨床検査技師等に関する法律に照らし合わせると、検査を実施する場合には、内部精度管理の実施や外部精度管理調査の受検が義務又は努力義務として求められています。病原体の核酸検査に分類される新型コロナウイルスの PCR 検査においては、厚生労働省事業「新型コロナウイルス感染症 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）及び令和 3 年度同調査（2021 年 7 月 21 日～2022 年 3 月 31 日）の結果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、検査の品質・精度の確保において留意すべきことを「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」としてまとめられ、厚生労働省から事務連絡¹⁾として周知されています。また、このマニュアルの留意点の理解を助けるため、公益社団法人日本臨床検査標準協議会（JCCLS）から、「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」が発行されています²⁾。さらに、最近、ISO/TS 5798:2022（体外診断検査システム－核酸増幅法による重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）の検出のための要求事項及び推奨事項）がまとめられ、一般財団法人日本規格協会から英和対訳版が発行されており³⁾、核酸検査の精度管理の参考になります。

精度管理においては使用する精度管理物質が重要になります。国際標準品としては、不活化ウイルス由来の WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA（NIBSC code:20/146）があります⁴⁾。こうした共通の物差しとなる標準品を整備することは重要で、新型コロナウイルス検査の標準化に NIBSC の標準品の導入が検討されています。この標準品の濃度は、コピー数ではなく、IU/mL 単位を使用しています。国際標準品の入手の制限が

あり、国内で入手しやすくする動きもあり、国際標準品を用い値付けされた国内の標準物質は国立感染症研究所から入手可能です。また変異ウイルス株由来の参照パネルについても入手可能となる動きがあります。

これらの SARS-CoV-2 が組み込まれた標準品を精度管理物質として入手できない、また、必要なバイオセーフティ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 で転写した SARS-CoV-2 RNA または SARS-CoV-2 RNA を組み込んだ安全性の高いウイルス粒子を検出法の精度管理物質として利用する方法があります。国際規格 ISO15189（臨床検査室-品質と能力に関する要求事項）では制度管理試料の項目 5.6.2.2 において、患者検体にできるだけ近い試料を使うことが推奨され、さらに第三者コントロール物質の使用が望ましいとされています。

核酸（RNA や DNA）の認証標準物質（CRM）の開発に関しては、国立研究開発法人産業技術総合研究所（産総研）で行われています⁵⁾。産総研・計量標準総合センター（NMIJ）では、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の認定制度（ASNITE）に基づき、ISO17034（標準物質生産者の能力に関する一般要求事項）および ISO/IEC17025（試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項）としての施設認定を受け、多くの CRM の開発が行われており、濃度の決定については原則、国際単位系（SI）にトレーサブルな手法を採用されています。遺伝子を高感度に絶対定量可能な技術であるデジタル PCR 法や質量分析法などの化学的計測技術で計測され、その単位は copies/mL や g/mL となります。新型コロナウイルス関連の CRM は国内ではまだありませんが、各国の計量研などで開発が進められています⁶⁾⁻¹¹⁾。16 か国の 21 の国立計量研究所と専門研究所は、共通の人工合成した SARS-CoV-2 RNA 断片を試料とした比較試験を行い、逆転写デジタル PCR (RT-Dpccr) を使用して、SARS-CoV-2 ウイルス RNA の量の高精度測定を世界中で達成できることを実証しています (CCQM-p199b)¹²⁾。

国内で入手可能な新型コロナウイルス関連の第三者コントロール物質の例を参考まで下表にまとめています。以下は、必ずしも CRM グレードとは限りませんが、入手のしやすさから精度管理物質としての利用が考えられます。

表. 新型コロナウイルス関連のコントロール物質の例 (2022年11月26日現在)

物質種類	メーカー	販売元	製品番号	製品名	包装	濃度	保管温度	遺伝子領域	備考
ウイルス粒子	AcroMetrix	Thermo Fisher Scientific	954517	AcroMetrix™ SARS-CoV-2 Control (RUO)	1.5 mL x 5 vials	不明	-20°C	Full Length Genome	独自のウイルス輸送培地中の不活化したSARS-CoV-2
	LGC Clinical Diagnostics (旧SeraCare)	ミナリスメディカル	0505-0159	AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit Full Genome	Positive : 1.5 mL x 5 vials Negative : 1.5 mL x 5 vials	5,000 copies/mL	2~8°C	Full Length Genome	アルファウイルスに全長約30KbのSARS-CoV-2のゲノム断片 (~4kb) を組み込み、複製能力をなくし熱処理をした模擬ウイルス
	LGC Clinical Diagnostics (旧SeraCare)	ミナリスメディカル	0505-0160 他 2種	AccuPlex™ SARS-CoV-2 Variant Panel 1 他 2種	Positive : 1.5 mL x 4 vials Negative : 1.5 mL x 1 vial	15,000 copies/mL	2~8°C	Full Length Genome	SARS-CoV-2の Wild Type、変異株UK B.1.1.7、S. Africa B.1.351、Brazil P1、Kappa B.1.617、Delta B.1.617.2、Delta Plus AY.1、オミクロン変異株B.1.1.529配列を組み込んだものあり
	Vircell Microbiologist	フィルジェン	MBTC030-R	AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL	10 vials	不明	2~8°C	Full Length Genome	不活化したSARS-CoV-2
RNA	AcroMetrix	Thermo Fisher Scientific	954519	AcroMetrix Coronavirus 2019 (COVID-19) RNA Control (RUO)	0.02mL x 2 vials	500cps/uL, 100cps/uL	-20°C or lower	Full Length Genome	Full length genomic RNA from SARS-CoV-2
	Twist Bioscience	スクラム	102024 他 (24 Genotype を個別販売)	Twist SARS-CoV-2 RNA Controls Control 2	100 µl x 1 vial	約100万 コピー/µL	-90 °C ~ -70 °C	Genomeの99.9%以上	汎用タイプその他、アッセイレディ乾燥ペレット品、カプセル型乾燥ペレット品もあり
	タカラバイオ	タカラバイオ	XA0142	Positive Control RNA Mix (2019-nCoV)	100 µl x 1 vial	1 × 10 ⁷ copies/µl	-80°C	N, N2	国立感染症研究所/病原体検出マニュアル用、2種混合
	日本遺伝子研究所	日本遺伝子研究所	JP-NN2-PC	新型コロナウイルス陽性コントロールRNA	250 µl x 各 1 vial	各1 × 10 ⁵ copies/µl	-80°C	N, N2	国立感染症研究所/病原体検出マニュアル用、2種/1セット
	Vircell Microbiologist	フィルジェン	MBC137-R	AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL	50 µl x 2 vials	12,500-20,000 copies/µl	凍結乾燥:2~8°C、再懸濁後:-80°C	Full Length Genome	精製された完全ゲノム凍結乾燥品、再懸濁量はRNAは50 µl
	Vircell Microbiologist	フィルジェン	MBC143-R 他 (6変異体を個別販売)	AMPLIRUN® SARS-CoV-2OMICRON RNA CONTROL 他 5種	2 vials	12,500-20,000 copies/µl	凍結乾燥:2~8°C、再懸濁後:-80°C	Full Length Genome	精製された完全ゲノム凍結乾燥品、再懸濁量はRNAは50 µl

コンタミネーションには、増幅産物の汚染（キャリアオーバーコンタミネーション）と検体やコントロール DNA や RNA の汚染（クロスコンタミネーション）があります。コンタミネーション防止に関しては、本稿の Q&A に繰り返し述べられています。特に、総論の Q2（陽性コントロールのコンタミネーション）、Q4（エリア分け）、Q7（ウイルス汚染の除去作業）、Q9（検査室の掃除）、各論：分析前プロセスの Q20（陽性コントロールの取扱い）、Q22（検体分注用ピペットの取扱い）、Q31（フィルター付きチップの使用）、各論：分析後プロセスの Q53（偽陽性となりうる要因）、Q63（PCR 後の廃棄物を捨てる際の注意）が参考になります。

例えば、キャリアオーバーコンタミネーションの防止策の一つとして、ウラシル-N-グリコシラーゼ（UNG）を反応系に添加することで、PCR 増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性判定を抑制する試薬があります。しかしながら、大量の PCR 増幅産物による汚染は防ぎきれない場合があります。このような場合やクロスコンタミネーションには、リアルタイム RT-PCR 反応液の調製は操作ごとに下記のようにエリア分けをして、物理的に隔離することが推奨されます。

- ・ エリア 1：反応液の調製を行う
- ・ エリア 2：反応液と鋳型の混合を行う

また、リアルタイム PCR 法では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。しかし、コンタミネーション発生の原因となりますので、PCR 増幅産物の入ったチューブの開閉は避ける必要があります。

参考資料

- 1) 事務連絡「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」について（周知）。厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部，4/15, 2022.
- 2) 日本臨床検査標準協議会（JCCLS），遺伝子関連検査標準化専門委員会。新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス。日本臨床検査標準協議会，2021.
- 3) 一般財団法人日本規格協会，ISO/TS 5798:2022，Technical Specification 5798: In vitro diagnostic test systems - Requirements and recommendations for detection of severe acute respiration syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by nucleic acid amplification methods.，技術仕様書 5798: 体外診断検査システム－核酸増幅法による重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）の検出のための要求事項及び推奨事項，2022.
- 4) NIBSC（英国国立生物学標準管理研究所），WHO 国際標準品，
<https://www.nibsc.org/science_and_research/idd/cfar/covid-19_reagents.aspx>
- 5) 精密工学会誌，Vol.87, No.1, 2021, pp21-24.
- 6) NIST（米国計量研），純物質系CRM（人工合成RNA），
<<https://www.nist.gov/programs-projects/sars-cov-2-research-grade-test-material>>
- 7) NIM China（中国計量研），純物質系CRM（人工合成RNA），
<<https://en.nim.ac.cn/node/656>>
- 8) UME（トルコ計量研），純物質系CRM（人工合成RNA），
<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-021-03284-w>>
- 9) JRC（EU），純物質系CRM（人工合成RNA），
<https://www.researchgate.net/publication/342410403_SYNTHETIC_SINGLE_STRANDED_RNA_IN_BUFFER_This_RNA_solution_is_intended_to_be_used_as_a_positive_quality_control_sample_in_the_testing_for_the_presence_of_the_coronavirus_SARS-CoV-2>
- 10) KRISS（韓国計量研），実試料系CRM，
<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-021-03846-y>>
- 11) NMIA（豪国計量研），実試料系CRM，
<https://www.industry.gov.au/sites/default/files/2020-12/sars-cov-2_c_of_a_b200921_feb_2021.pdf>
- 12) 国際度量衡局（仏: Bureau international des poids et mesures; BIPM），プレスリ

リース, コロナPCR関連の国際比較 (CCQM-p199b),
<<https://www.bipm.org/en/-/2020-nmi-covid>>

7. 変異株解析の使い分け (今泉・石毛)

VOC や VOI といった変異株の検出・同定には塩基配列解析法とリアルタイム PCR 法の 2 つがあります。塩基配列解析法には次世代シーケンス法を用いてウイルスの全ゲノムを解析する方法と、サンガー法を用いて S 遺伝子などの特定の領域を解析する方法があります。次世代シーケンス法は網羅性が高く複数の検体を同時に解析できますが、バイオインフォマティクス解析を必要とし実験技術的にも難易度の高い手法です。サンガー法は塩基配列解析の標準法であり、バイオインフォマティクス解析を必要としないため、少数検体で特定の領域のみを解析する場合には次世代シーケンス法よりも適しています。塩基配列解析では未知の変異を含む全ての変異を検出することができますので、新しい変異株を同定する場合には必須の解析手法です。一方、リアルタイム PCR 法は、特定の変異 (L452R や N501Y 等) に対して野生型か変異型かを判別するスクリーニング検査です。塩基配列解析よりも簡便に変異を検出できますが、変異株の推定には複数の変異について調べる必要があります。

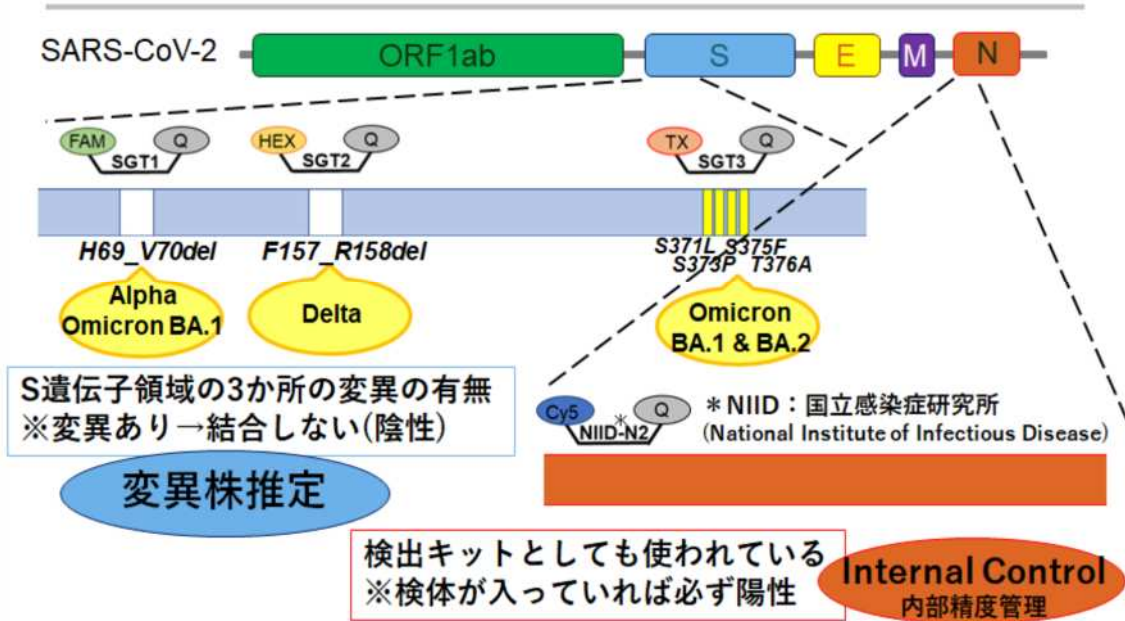
例) 千葉大学病院での変異株スクリーニング

千葉大学病院では S-gene target failure (SGTF) を拡張させることで、日本で流行した 4 種類の VOC (Alpha, Delta, Omicron BA.1, Omicron BA.2) を推定できる Multiplex RT-PCR 法を開発し、変異株スクリーニングを行っております。

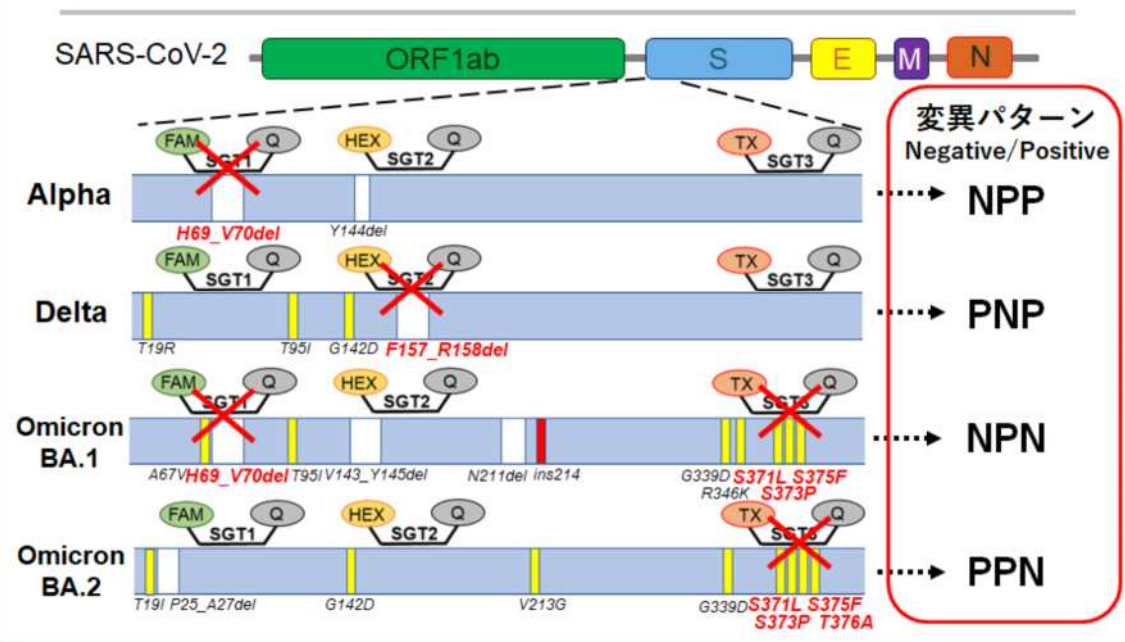
SGTF とは複数領域 (ORF1ab, E, S, N 等) を検出した際に S 遺伝子領域のみ偽陰性を示す現象であり、S 遺伝子の H69_V70del 変異によって引き起こされることが知られています。この現象を利用して、各 VOC に特徴的な 3 か所の S 領域の変異 (SGT1: H69_V70del, SGT2: F157_R158del, SGT3: S371-T376) をターゲットとし、その変異の有無のパターンから変異株を推定します。また、N 領域は internal control として検出します。それぞれ異なる蛍光色素で標識したプローブを設計して Multiplex RT-PCR にすることで、1 検体 1 ウェルで検出可能です。各 VOC の変異パターン (Positive/Negative) は以下の通りです。VOC [SGT1, SGT2, SGT3]: Alpha [NPP], Delta [PNP], Omicron BA.1 [NPN], Omicron BA.2 [PPN]

ピットフォールとして、変異の多い S 遺伝子をターゲットとしているため、プライマープローブ領域に稀な変異がある可能性が考えられます。この場合、蛍光強度の低下や増幅効率の低下を引き起こし、偽陰性となることがあります。流行と異なる変異パターンや新たな変異パターンを検出した場合はゲノムシーケンスをして確認することが望ましいといえます。

プローブ設計



変異パターン



[出典]

Y. Imaizumi, et. al, Development of multiplex S-gene-targeted RT-PCR for rapid identification of SARS-CoV-2 variants by extended S-gene target failure, *Clin. Chim. Acta* 2022 Nov 1; 536: 6-11.

8. 内部精度管理 (Internal Quality Control; IQC) と外部精度評価 (External Quality Assessment; EQA) (前川)

核酸検査を行う場合、他の検体検査と同様、導入時に分析法の妥当性確認・検証、内部精度管理 (IQC)、外部精度評価 (EQA) が重要である。

IQCは、施設内で当該の検査結果が、ばらつきが少なく行われているか、許容範囲内 (管理限界内) に収まっているかを確認して管理することである。すなわち「精密さ」を主に確認する作業である。具体的には、同じ管理試料 (市販の精度管理用物質、患者検体から調製した試料など) を測定して管理する。管理限界を外れた場合は、原因を究明し、改善する。

EQAは、他施設と比して自施設の検査の精確さをみるものであり、多施設が参加する外部精度評価プログラム (通称、精度管理調査、コントロールサーベイ) が最上位にある。このプログラムに参加することで、自施設が目標値からどれくらい外れているかを定期的に調べることができる。測定法の使用状況や測定法間の特性などを知ることができる。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の核酸検査の精度管理調査では、厚生労働省委託事業¹⁾⁻²⁾、CAPサーベイ³⁾⁻⁴⁾がある。また、日本臨床衛生検査技師会、日本衛生検査所協会でも行われている。

- 1) 令和3年度厚生労働省委託事業「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」報告書。 <<https://www.mhlw.go.jp/content/000929808.pdf>>
- 2) 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。 <<https://www.mhlw.go.jp/content/000930137.pdf>>
- 3) <<https://www.cgikk.com/cgicapsurvey.html>>
- 4) SARS-CoV-2 Proficiency Testing/External Quality Assessment (PT/EQA) and Quality Improvement Programs. <<https://www.cap.org/laboratory-improvement/proficiency-testing/sars-cov-2-proficiency-testing-programs>>

9. 「感染症法」上の2類から5類へ (第8波への対応)

首相官邸 新型コロナウイルス感染症対策本部ホームページより

<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/novel_coronavirus/taisaku_honbu.html>

新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけの変更等に関する対応方針について
(令和5年1月27日 新型コロナウイルス感染症対策本部決定)

1. 新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけ
 - 「新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけについて」(令和5年1月27日厚生科学審議会感染症部会)を踏まえ、オミクロン株とは大きく病原性が異なる変異株が出現するなどの特段の事情が生じない限り、5月8日から新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) について、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (平成10年法律第114号。以下「感染症法」という。) 上の新型インフルエンザ等感染症に該当しないものとし、5類感染症に位置づける。

- なお、位置づけの変更前に改めて、厚生科学審議会感染症部会の意見を聴いた上で、予定している時期で位置づけの変更を行うか最終確認した上で実施する。
- 今後、オミクロン株とは大きく病原性が異なる変異株が出現するなど、科学的な前提が異なる状況になれば、ただちに対応を見直す。

以上のように決定された。

<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/novel_coronavirus/th_siryou/kihon_r2_050127.pdf>

10. ポストコロナへの応用（SARS-CoV-2のPCR検査の経験をゲノム医療分野に発展させるには）（松下）

A. 体細胞遺伝子検査と遺伝学的検査（生殖細胞系列遺伝子検査）への応用

A-1. 院内連携、外部委託業務について

遺伝子関連検査を一元管理する院内組織のセンター化が必要なこと。

- ・ 導入時の validation（妥当性確認）、verification（検証）。
- ・ 内部精度管理、外部精度評価プログラムの国内の質保証体制を構築する。
- ・ 件数が少なければ、院内検査室において外部からも受託する（検査依頼、搬送、結果報告など一連の作業のシステム化が必要）。
- ・ 検査の質保証、経済性、リスク管理、システム化（目に見えるサービス向上、付加価値、研究との合体、皆が得する）、要員の教育・研修。

A-2. 遺伝情報（ゲノム医療全般、精密医療）を解釈・実施するための人材育成の必要性

2019年6月にがん組織を用いるがん遺伝子パネル（Cancer gene panel: CGP）検査が保険収載された。2021年8月には血漿中の cfDNA（cell free DNA）を用いたリキッドバイオプシー（Liquid CDx）も保険収載された。近年は非小細胞性肺癌に対するオンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム、AmoyDx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル（*E G F R*, *A L K*, *R O S* Exon14）~~E~~ 卵巣癌に対する相同組み換え修復欠損を調べる myChoice 診断システム（homologous recombination deficiency: HRD 検査）、MSI 検査などの保険収載されたコンパニオン検査も多い。**SARS-CoV-2 の PCR 検査の経験をゲノム医療分野に発展させることが可能である。**

- (1) 検体や情報の一元化された管理
- (2) 検査精度の確保
- (3) 検査データの評価・解釈
- (4) 患者への検査説明

臨床検査医・臨床検査技師には、CGP検査をはじめとする遺伝子関連検査へのリテラシーを高め知識を深めるための教育の機会を活用して遺伝子検査・遺伝医学に関連する主体的な資格の取得を推奨したい。CGP検査の臨床検査としての品質を確保し良質な医療を提供するため、エキスパートパネルでは臨床検査医・検体系の臨床検査技師が主体的に参加することが求められる。実際、2023年のがんゲノム医療中核拠点、同拠点病院の施設要件では、1

診療体制の(2)診療従事者として、②臨床検査を行う部門の人員について、以下の要件を満たすことが記載された。

ア がん遺伝子パネル検査に関連する臨床検査医学に関する専門的な知識及び技能を有する常勤の医師が配置されていることが望ましい。

イ がん遺伝子パネル検査における血液検体等の取り扱いに関する専門的な知識及び技能を有する常勤の臨床検査技師が配置されていることが望ましい。

B. ポストコロナの全ゲノムシーケンス時代の検査部の役割

B-1. 人材の育成と増員

検査技師養成の大学などで専門科を設置する等がある。全国的な教育やトレーニングの機会が望まれる。高度な知識・確かな技術力・的確な判断力を育むため、倫理・情報セキュリティに精通した人材を育成する必要がある。臨床検査として検査前・検査後プロセスに人手がかかるため増員の必要もあるかもしれない。

B-2. 他部署との連携

遺伝子診療部（遺伝カウンセリングに関わる）、病理部、医療情報部（診療情報ネットワーク）、診療各科との連携も必要である。

C. ゲノム医療における検査部の今後

本稿で記述した内容としては、1. 臨床からの要望に応じた検査実施体制の整備（院内および外部委託検査）として、遺伝子検査のマネジメント業務：検体保存、外部への委託業務など、遺伝子検査の品質保証（精度管理）：外部委託検査でもフォードバック体制が挙げられる。検査の解釈（診断）および問合せへの対応も重要である。そのために検査部門で結果の解釈を行うスキルを育成する検査医、臨床検査技師の卒後教育の整備が求められている。分析後プロセス（評価・解釈）が今後は重要となるため臨床検査医が遺伝学的検査の診断に関与する必要がある。その他、ゲノム医療に関するカンファレンスへの参加もエキスパートパネルにおける議論の質の向上に検査部として貢献すべきと考える。ゲノム情報の管理やデータアクセスに関する管理体制（ゲノム情報の管理や、診療科や医療情報部と連携して管理体制を整備すること）も検査部が主体的に関わる業務である。

11. サル痘などの新興感染症への対応

サル痘とはサル痘ウイルス（ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属のサル痘ウイルス）感染による急性発疹性疾患で、感染症法では4類感染症に位置付けられている。アフリカ大陸の流行地域で主に発生が確認されていたが、2022年5月以降、欧米を中心に世界各地で感染が確認されており、2022年7月には日本国内でも感染例が報告された。

診断にはPCR検査による遺伝子の検出や、ウイルス分離・同定、ウイルス粒子の証明、蛍光抗体法などの方法があるが、流行初期段階では、新型コロナウイルス感染症と同様にPCR技術を用いた検査が用いられると考えられる。

新型コロナウイルス対策で、多くの医療機関にPCR検査装置が配置された。遺伝子配列情報や文献を調べることでプライマー、プローブの設計を行うことができる。サル痘のよう

な新興感染症の流行期では新型コロナウイルスのような混乱が起きないように、早い段階でウイルスの情報を調べ、PCR 検査体制の準備をすることが重要である。

また、サル痘の場合も早い段階で各メーカーから研究用試薬として検査キットが販売されている（2022年11月時点）ので、汎用のリアルタイム PCR 装置を備えておくことも必要だと考える。

- 流行前に新興感染症の病原体情報を検索し、緊急時に迅速な対応ができるよう体制を整えておく。自作の検出系でもよいが、できれば文献にあるものが良い（検出できることが確認できている）。
- 体外診断用試薬の前に研究用試薬が販売され、多くが汎用のリアルタイム PCR 装置に対応しているので装置の準備と取り扱いの教育を行う。

12. 海外の状況（WHOなど、ウイズコロナの時代）

WHOはCOVID-19の対応強化支援のための6つのポリシー・ブリーフを発行している。これらは以前発行されたガイダンスでのWHOの推奨事項に基づき作成されており、パンデミック終息のために必要な重要な要素の概略を示している。ポイントに、最もリスクの高いグループのワクチン接種、サーベイランスの維持、ウイルス検査と遺伝子配列解析、早期の医療ケアの確保、的を絞った公衆衛生・社会的対策（症例の隔離、マスクの使用、距離、換気、手洗いなど）の適用などがあげられ、明確でオープンな情報伝達を可能にする社会への取り組みとなると考えられている。

<https://extranet.who.int/kobe_centre/ja/covid>

<<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-policy-briefs>>

13. 各企業へのユーザーからの質問を整理する（吉本）

Q. 検体種別で気を付けるべき取り扱いのポイントが知りたい。

A. 検体採取時の留意点は、国立感染症研究所『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 ～2021/03/19 更新版～』をご参考ください。また、Q3（検体種によるPCR検査の操作や結果の違い）とQ5（感染性のある検体の取り扱い方やバイオセーフティの心得）もご参考いただければ幸いです。

Q. 元の検体（ぬぐい液、唾液）と抽出後のRNA溶液で適切な保管条件は変わるか？

A. スワブは乾燥することを避け、密封できる容器に保管してください。検体採取後は、可能な限り速やかに氷上または冷蔵庫（4℃）に保管し、輸送開始までに48時間以上かかる場合は凍結保存（可能であれば-80℃以下）します。（Q3および18参考）抽出後のRNA溶液は、検査直前まで氷上または冷蔵庫（4℃）に保管し、長期保存の場合は凍結保管（可能であれば-80℃以下）します。

Q. PCR検査と抗原検査の両方で使用できる不活化試薬はあるか？

A. ご用意しておりません。シスメックスのPCR用不活化試薬にはタンパク質を変性させる成分が含まれており、抗原検査にはご使用いただけません。

Q. コロナ検査においてPCRを阻害する物質と気を付けるポイントを教えてください。

A. 唾液などの検体に含まれる夾雑物の影響により反応阻害（非特異増幅含む）が起こる可能性があります。PCR装置トラブルが考えにくい場合は、PCR反応阻害物質の濃度を下げることが目的として、検体を希釈しての再検査が推奨されます（Q55参考）。

また、核酸増幅不良の要因の一つとして、検体保存方法が不適切であったことによる核酸分解も考えられますので、ICの増幅結果を参考にいただき、検体の取扱いには十分にご注意ください。さらにプライマー&プローブの認識配列に変異を有する変異株の影響があげられます。臨床症状から新型コロナウイルスの感染が疑われる場合は、各社が提供する変異株の調査情報を確認するか、不明な場合は各社へお問い合わせください。変異株による増幅への影響が疑われる場合には、変異検査の実施が有効です。

Q. PCR装置のソフトウェアでCt値が算出されているが増幅曲線を見ると増幅が見られない場合の解釈は？

A. ノイズやPCR装置の解析アルゴリズムによる不適切な増幅曲線の作成によってCt値が算出されている可能性があります。手動でThresholdを設定し直し、再解析していただくことをお勧めします。

Q. Ct値と臨床的意義の関連性が知りたい。

A. [患者内のウイルス量（Viral load）] ≠ [検体中のウイルス核酸量] ÷ [Ct値]と考えられており、検体中のウイルス核酸量はCt値で推定できるものと解釈できません（参考資料1）。ただし、測定結果の判定と臨床的背景が一致しない場合もあります。詳しくは、Q59をご参考ください。

Q. PCR検査ではどの程度の検出感度があるのか？

A. PCR検査の手法（特に検査への検体の持ち込み量、核酸抽出精製の有無、反応系への核酸の持ち込み量）が各種キットや試薬、方法によって異なるため、カットオフに同一のCt値を採用している検査系であっても、最小検出感度は同一とは限りません。そのため、各社試薬の添付文書に従い、判定および再検を実施ください。また、各施設において、使用する試薬のCt値について何コピーまでを許容するか、再検査するかについても検証し、陽性判断の基準を設定することも重要です。詳しくは、Q48、49、q1をご参照ください。

Q. PCRキット毎に検出する領域が異なるのはなぜか？

A. SARS-CoV-2のヌクレオカプシド（N）領域（N1、N2含む）は配列保存性が高いため、

多くの試薬で対象領域とされています。試薬の詳細仕様については各社にお問い合わせください。

Q. ICとしてヒト由来の遺伝子を検出している製品があるが、どのようなメリットがあるか？

A. ヒト由来の遺伝子をICとして利用することで、PCRの反応系に問題がないことを確認できるほか、検体の品質や採取量の指標として利用することができます。詳しくはQ33、34をご参考ください。

Q. ICが検出されなかった場合に考えられる要因は？

A. 検体の採取、もしくは抽出ミス、PCR反応液への検体の添加ミス、PCR反応液の調製または分注ミス、試薬劣化、PCR装置の不具合、検体が不適切に取り扱われたことによる核酸分解などが考えられます。

解決策として、まずは、当該検体と同時に測定された陽性コントロール（PC）の結果を確認し、試薬や装置に問題がなかったかを確認ください。問題なければ（過去の測定と同等の値であれば）、検体側の問題として再度PCR反応を検証ください。それでも、ICが検出されない場合は再抽出あるいは再採取をお勧めします。

Q. ダイレクトPCRキットと核酸抽出が必要なPCRキットのそれぞれのメリットが知りたい。

A. ダイレクトPCRキットは核酸抽出を行うことなく、検体をそのままPCRへ供することができるため、操作性や時間短縮、感染リスクの低減の面でメリットがあります。一方、核酸抽出が必要なPCRキットでは、核酸抽出を行うことで検体中の夾雑物の除去やRNAの濃縮が行え、検出率を高めることができると考えられています。

Q. 今後、検査の主流はPCRから抗原に移行していくのか？

A. 抗原検査（定性、定量）とPCR検査は感度が異なるため、検査対象者の状況により適用となる検体種が異なります。よって、患者の状態や使用目的に応じて適切な検査手法を選択することが肝要です。詳しくはq3、および関連するトピックスの「4. 抗原定量検査とPCR検査の比較」をご参照ください。

Q. 感染症検査で使用したPCR装置をがん等の他項目の検査で利用したいが、問題ないか？

A. 問題ございません。但し、装置やその周辺において検体やPCR増幅産物による汚染が疑われる場合は、適宜速やかな除染作業をお勧めします。

14. IVDとLDTs（松下）

SARS-CoV-2 核酸検査は 2020 年初頭では、各検査室が独自で開発した検査（LDTs）として行われた。具体的には国立感染症研究所から発出された情報を用いて、各検査室が

SARS-CoV-2 に対する PCR 検査を立ち上げる必要性があった。その後薬事承認を得た IVD 化キットが販売されるようになった。近年急速に臨床検査として行われている NGS 解析(例えばがんゲノム医療)の場合には、SARS-CoV-2 の PCR 検査とは比較にならないほどの多くの分析前、分析、分析後プロセスを必要とした LDTs として検査室で行われるようになってきている。SARS-CoV-2 核酸検査を LDTs として行った経験を生かして、ゲノム医療の NGS 解析を院内化、国内化するためには、検査精度確保の観点からも LDTs の明文化(国内における定義)が必要と考えられる。

15. 核酸増幅法の呼称について (松下)

核酸増幅法のわかりやすい呼称についても整理が必要と思われます。核酸増幅法:TMA (Transcription Mediated Amplification)、NASBA (Nucleic Acid, Sequence-Based Amplification)、LCR (Ligase Chain Reaction) などが開発され、これらの核酸増幅法を利用した遺伝子検査法を総称して NAT と呼んでいます。米国では NAAT と略され、SARS-CoV-2 の迅速承認の仕組みがあります。

Marble HD, Bard AZ, Mizrachi MM, Lennerz JK. Temporary Regulatory Deviations and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) PCR Labeling Update Study Indicate What Laboratory-Developed Test Regulation by the US Food and Drug Administration (FDA) Could Look Like. J Mol Diagn. 2021 Oct;23(10):1207-1217. doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.07.011. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34538703; PMCID: PMC8444018.

NAT (核酸増幅検査) の中に、PCR 法、LAMP 法、TMA 法などが含まれる。

<<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/bacteriology/online/iloha/column/naat.shtml>>

(参考) 新しい SARS-CoV-2 の迅速核酸増幅法 (NAT) について。

<http://www.kainos.co.jp/jp/products/covid/covid_05.html>

<<http://www.kainos.co.jp/jp/products/pdf/LM-1000.pdf>>

Nucleic acid amplification test のことを、国内では NAT と呼称しています (日本赤十字社の表記)。

<https://www.jrc.or.jp/mr/blood_product/safety/nat/>

<https://www.bs.jrc.or.jp/hkd/hokkaido/process/m3_01_01_02_00000138.html>

厚労省 HP も核酸増幅検査を NAT と表記しています。

<<https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/5anzen1.html>>

各論 2：「サル痘（M 痘）その他の新興感染症について」

サル痘は、1970 年にザイール（現在のコンゴ民主共和国）でヒトでの初めての感染が確認された。オルソポックスウイルス属のサル痘ウイルスによる感染症で、中央アフリカから西アフリカにかけて流行している。日本では、サル痘については、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成 10 年法律第 114 号）に基づき、4 類感染症に位置づけ、サル痘の患者を診断した医師は、都道府県知事等に対して直ちに届け出ることを義務づけています。2022 年 5 月以降、従前のサル痘流行国への海外渡航歴のないサル痘患者が欧州、米国等で報告されている。欧米を中心としたサル痘の国際的な感染の拡大については「サル痘に関する情報提供及び協力依頼について」〔令和 4 年 5 月 20 日付け（令和 4 年 8 月 10 日最終改正）厚生労働省健康局結核感染症課事務連絡〕が発出されている。日本国内では感染症発生動向調査において集計が開始された 2003 年以降、輸入例を含めサル痘患者の報告はなかったが、2022 年 10 月 6 日時点で 7 例のサル痘患者の発生が確認されており、その中には本人に海外渡航歴がなく、海外渡航歴のある者との接触歴が確認できない事例も報告されている。自然宿主はアフリカに生息するげっ歯類が疑われているが、現時点では不明である。稀に流行地外でも、流行地からの渡航者等に発生した事例がある。症状は発熱と発疹を主体とし、多くは 2-4 週間で自然に回復するが、小児等で重症化、死亡した症例の報告もある。これまで我が国においては、ヒトのサル痘の発生事例は報告されていないが、今般のヒトの感染事例については、アフリカ大陸以外の複数の国で、渡航歴のない感染者が発生しており、市中感染の発生が示唆されることから、我が国における輸入例等の発生に注意する必要がある。

<<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansenohanashi/408-monkeypox-intro.html>>

<https://www.niph.go.jp/h-crisis/wp-content/uploads/2022/05/20220530110659_content_000942303.pdf>

新興感染症：最近新しく認知され、局地的にあるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症で主に以下のような疾患が含まれる。

<<https://www.niid.go.jp/niid/ja/route/emergent.html>>

- SARS（重症急性呼吸器症候群）、鳥インフルエンザ、ウエストナイル熱、エボラ出血熱、クリプトスポリジウム症、クリミア・コンゴ出血熱、後天性免疫不全症候群（HIV）、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、腸管出血性大腸菌感染症、ニパウイルス感染症、日本紅斑熱、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）感染症、マールブルグ病、ラッサ熱。

国内では国立感染症研究所が対応するが、流行時などの緊急時には検査系の立ち上げが必要になるかもしれない。

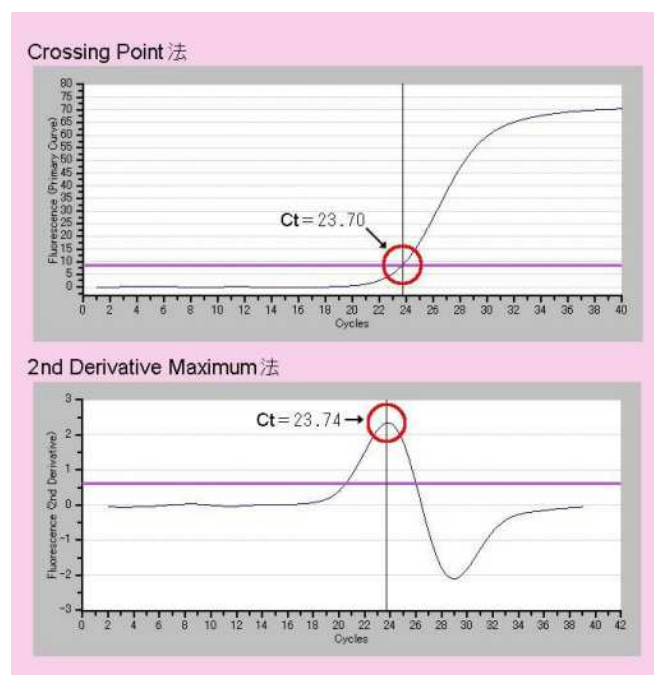
(参考資料 1)

解析法

1. Ct 値の算出方法

Ct 値の算出方法には、閾値と増幅曲線の交点を Ct 値とする方法（Crossing Point 法）の他に、増幅曲線の 2 次導関数を求めてそれが最大となる点を Ct 値とする方法があります（2nd Derivative Maximum 法）。前者では、閾値を指数関数的増幅域の任意の位置に（自動もしくは手動で）設定して解析しますが、その位置により Ct 値が変化するので実験間の誤差が大きくなりやすい傾向があります。一方、後者は、最も増幅速度の変化率が大きい時点を Ct 値とするので、閾値により Ct 値が変化することがなく再現性が高く、また、装置の検出誤差による影響も排除できるため高精度な方法と考えられています。（吉本）

しかし、後者の計算方法にも対応しているリアルタイムPCR装置は、Thermal Cycler Dice Real Time System、Smart Cycler（以上、タカラバイオ社）や LightCycler（ロシュ社）など一部の装置に限られています。



2. 検量線

スタンダードサンプルの希釈系列により得られた検量線は、未知サンプルの定量に適用できるだけでなく、そこからは、PCR増幅効率や定量可能な範囲など、有用な情報を得ることができます。実際に検量線を作成する際には、まず、5～6段階濃度のスタンダードサンプルを用意します。次に、これらを鋳型としてリアルタイムPCRを行い、それぞれの

濃度のCt値を算出します。Ct値と初期鋳型濃度の対数値は直線関係にあり、検量線を作成することができます。

【良い検量線とは】

検量線を評価するポイントは、傾きと直線性の二つです。傾きからはPCR増幅効率を計算することができます、80～120%が適正範囲とされます。PCR増幅効率が悪い場合には、プライマーを再設計します。PCR増幅効率が理論値より高い場合には、逆転写反応またはPCRの阻害物質の存在が疑われるので、試料の調製方法を再検討します。直線性は、相関係数（ r^2 ）で評価し、その値が0.98以上であることが望ましいです。低濃度あるいは高濃度のポイントが直線からはずれる場合には、それらのポイントを除いて相関係数が0.98以上になるようにします。濃度に関係なくバラツキがあり相関係数が0.98に満たない場合は、実験系全体を見直したほうがよいです。リアルタイムPCRは精度の高い技法で、通常、検量線の直線性が問題となるようなケースはまれです。

【増幅効率の算出法】

リアルタイムPCR装置によっては、検量線の傾きから自動的にPCR増幅効率が算出されるものもありますが、検量線の傾きが分かっているならば、次のような数式を用いて自分で計算することもできます。ただし、検量線のX軸、Y軸の取り方と初期鋳型量を対数に変換したときの底により数式が異なるので注意します。

$$E = 10^{[-1/\text{slope}] - 1}$$

(X 軸に初期鋳型濃度(Log10)を Y 軸に Ct 値を取った場合)

現在は、検量線の傾きからPCR増幅効率を求めるのが一般的ですが、この方法では、①PCR効率をoverestimateしがちであること、②個々のサンプルによりPCR阻害物の含量が異なる場合にはそれぞれPCR増幅効率が異なるがその対応が困難であること、などの理由から新しい PCR 増幅効率の計算方法も考案されています。それらの方法では、指数関数的領域の増幅曲線の傾きからPCR増幅効率を算出するので、検量線は必要ありません。スタンダードサンプルの測定が不要で反応数を少なくできること、個々のサンプルについて PCR増幅効率を確認できることなどのメリットがあります。

【検量線作成用のスタンダードサンプル】

検量線作成用のスタンダードサンプルとしては、基本的に、目的遺伝子の配列を有しているDNAやRNAなら何でも使用できます（プラスミドDNAやin vitro転写産物など）。しかし、スタンダードサンプルと実際に測定する未知サンプルについてPCR増幅効率が一致していかなくてはならないので、極端に形状が異なるDNAはスタンダードサンプルとして適当ではありません。例えば、ゲノムDNAに組み込まれた遺伝子のコピー数を定量するときに、プラスミドDNAをスタンダードとして使用すると正確な結果が得られないことがあります。これは、サイズが大きく複雑な配列を有するゲノムDNAと小さなプラスミドDNAとでは同じプライ

マーを用いてもPCR反応性が一致しないことがあるためです。

スタンダードサンプルとしては、できるだけ測定対象である実サンプルの形状に近いものが望ましいです。mRNA発現解析には目的遺伝子が発現している total RNA（あるいはtotal RNA鋳型として合成したcDNA）を、SNPsタイピングにはWildタイプとMutantタイプのゲノムDNAをスタンダードとして使用します。このようなスタンダードの入手が困難な場合は、目的の配列を合成することになりますが、その場合にもプライマーがアニーリングする配列とPCR増幅領域だけでなくその前後の配列も少し加えた配列を合成すると良いです。

◎できるだけ実サンプルに近い形状のDNAまたはRNAがスタンダードとして望ましいです。

【RNAとcDNAのどちらを段階希釈するか】

リアルタイムRT-PCRでスタンダードサンプルとしてRNAを使用して検量線を作成する場合、①逆転写反応によって得られたcDNAを段階希釈してリアルタイムPCRを行う方法と、②RNAを段階希釈して逆転写反応およびリアルタイムPCRを行う方法の2通りが考えられます。これらは似ているようですが、厳密には評価している内容が異なり、何を評価するかによっていずれか適切な方を選択すべきです。

①cDNAを段階希釈する方法

この方法で作成される検量線には逆転写反応は関係なく、純粋にPCR増幅効率を評価することができます。なお、適切なバッファー（EASY Dilution (for Real Time PCR) ; 製品コード9160）で段階希釈したcDNAサンプルは、凍結融解を繰り返さなければ冷凍保存して後の解析に使用することができます。

②RNAを段階希釈する方法

この方法で作成される検量線は、鋳型RNAの量依存的な逆転写効率の変動とPCR増幅効率の両方を反映しています。①の解析と併せて行うことにより、逆転写反応の評価を行うことができます。同じ量のRNAを使用すると、理想的には①と②の検量線は一致すると考えられ、両者にズレが生じた場合、その部分は逆転写反応に起因するものと推測されます。このようなズレがよく観察されるケースとして、鋳型RNA量が多すぎる場合が挙げられます。検量線を作成すると、最もRNA量が多いポイントだけ予想よりも逆転写の効率が低い場合があり、この原因としては、RNA量が多すぎて十分に逆転写反応が行われなかった、または、RNAに逆転写反応を阻害するような物質が混入していたといったことが疑われます。いずれの原因であっても、このRNA量はこの系で使用可能な上限を超えてしまっていることが分かります。以上のように、②の検量線からは適切なRNA使用量を知ることができます。

実際のリアルタイムRT-PCR実験において重要なのは各プライマーによるPCRの増幅効率

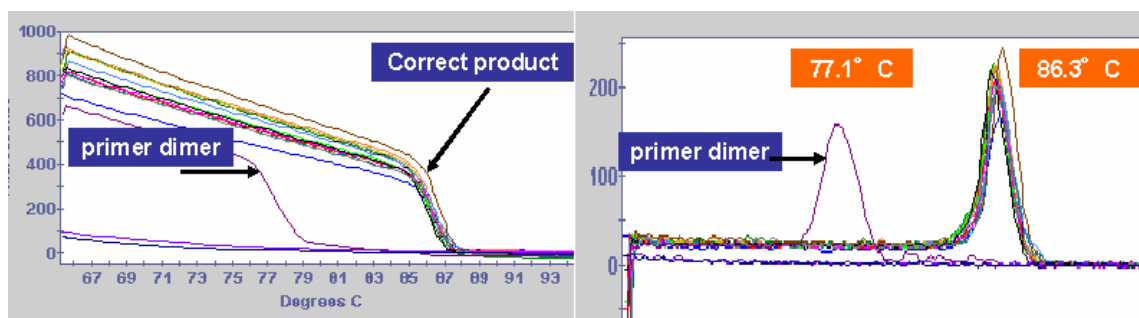
であり、①の検量線を定量に用いるとよいでしょう。②の検量線からは適切なRNA使用量を知ることができますが、いつも同じ逆転写反応系を用いている限り、その範囲は大きく変動するものではありません。一度、確認しておけば十分で、RNAに逆転写反応阻害物質が混入している心配がない限り、毎回、実施する必要はないでしょう。

①の検量線では「逆転写の効率を無視している」と指摘されることがありますが、②の検量線の傾きも逆転写の効率を表している訳ではありません。①と②の検量線を比較すると、RNA量依存的な逆転写効率の変動を確認することはできますが、逆転写効率の測定はできません。また、実際の発現解析では、一定量のRNAを用いてサンプル間の比較を行うので、RNAの量依存的な逆転写効率の変動があったとしても結果に影響を与えることは少ないです。そのRNA量が適正な範囲内であれば、それで良いということです。

◎ PCR増幅効率を知りたいときは、cDNAを段階希釈する。適切なRNA使用量を知りたいときは、RNAを希釈します。

3. 融解曲線分析

増幅曲線の検出にインターカレーター（TB Green など）を用いる場合には、融解曲線分析により増幅産物の確認を行うことができる。融解曲線分析では、PCR後にPCR反応液の温度を徐々に上げていき、インターカレーターの蛍光シグナルをモニタリングします。最初は、PCR増幅産物が二本鎖を形成し蛍光シグナルを発していますが、ある一定の温度に達すると一本鎖に解離し、インターカレーターの蛍光シグナルは急激に低下します。このときの温度が融解温度（ T_m 値）であり、増幅産物の配列に固有の値です。



【融解曲線分析と電気泳動】

以前に使用した実績のあるプライマーでは、融解曲線分析でPCR増幅産物の T_m 値を調べ、正しい増幅が行われたことを確認できますが、はじめて使用するプライマーでは、そのPCR増幅産物の T_m 値が分からないので、融解曲線分析だけでは判断できません。新しいプライマーを用いるときは、融解曲線分析の T_m 値を調べるとともに、一度、PCR増幅産物を電気泳動して正しいサイズの断片が得られていることを確認しておきます。さらに、必要に応じて増幅産物のシークエンス解析まで行うこともあります。

単一の断片が増幅している場合には、通常、融解曲線はシングルピークとなります。融解

曲線がブロードであったり、二つ以上のピークが出たりした場合には、非特異的増幅が起こっている可能性が高いです。例外的に、ピークの肩部分にマイナーピークがあるような場合には、それらのPCR増幅産物を電気泳動してみると、単一バンドとして検出されることがあります。これは、増幅した断片にGC含量などの偏りがあり、融解曲線分析の際に一気に解離しなかったためであり、この場合には、融解曲線分析がシングルピークにならなくても問題ありません。

4. 絶対定量と相対定量

定量方法には、大きく分けて絶対定量と相対定量の2種類があります。絶対定量では、未知サンプルの絶対量（コピー数）を測定しますが、相対定量では、遺伝子の絶対量ではなく、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子の測定を行い、リファレンス遺伝子に対するターゲット遺伝子の相対量を求めてサンプル間で比較します。

【絶対定量】

標準サンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルの絶対量を測定する方法です。絶対量（コピー数）が既知で、未知サンプルと同じ配列を持った標準サンプルが必要です。

【相対定量】

相対定量は、遺伝子発現解析で一般的に用いられており、ある遺伝子の発現量が未知サンプルにおいてコントロールサンプルに対してどれだけ増減しているか、ということ解析する方法です。相対定量実験では、発現量を求めたいターゲット遺伝子の他に、必ずリファレンス遺伝子の測定も行います。リファレンス遺伝子は、サンプル間の鋳型量の標準化を行うためのものであり、遺伝子発現解析の実験では通常、ハウスキーピング遺伝子が用いられます（「5. 補正方法」を参照）。解析時には、まず、リファレンス遺伝子の定量値を用いてサンプル間の鋳型量の標準化を行い、次に、標準化された値をコントロールサンプルと比較して発現量の変動を調べる（詳しくは、「6. 相対定量解析の手順」を参照）。なお、相対定量には、検量線を用いて定量する一般的な方法の他に、検量線を用いずに定量できる方法もあります。

【検量線法】

スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルの濃度を決定する一般的な定量方法です。定量するすべての遺伝子について検量線を作成し定量します。

【 $\Delta\Delta Ct$ 法】

$\Delta\Delta Ct$ 法では、検量線を作成せずに定量を行うことができます。ただし、測定するすべての遺伝子についてPCR増幅効率がほぼ一定であることが前提なので、予備実験を行い、各遺伝子についてPCR増幅効率を調べておく必要があります。

5. 補正方法

理想的には、サンプルあたりの細胞数または総mRNA発現量を測定して比較したいのですが、それは現実的には不可能です。そこで、リアルタイムRT-PCRによる発現解析では、ハウスキーピング遺伝子の発現量で補正を行うことが多いです。正確な解析結果を得るには、その実験系で発現量が変動しないハウスキーピング遺伝子を選んで用いることが重要であり、そのようなハウスキーピング遺伝子は、実験系ごとに異なるので、その都度、選びなおさなくてはなりません。

【ハウスキーピング遺伝子】

従来、ハウスキーピング遺伝子としては、GAPDHや β アクチンがよく用いられてきましたが、近年、これらの遺伝子も実験条件によっては変動するケースがあることが報告されています。1種類のハウスキーピング遺伝子では正確な補正を行うには不十分であり、現在、最も信頼性が高いとされている補正方法は、複数のハウスキーピング遺伝子を用いる方法です。この方法では、いくつかのハウスキーピング遺伝子の発現量を測定し、その中で変動が小さいと思われるものを選択して使用します。最適な補正用遺伝子を選択するソフトウェアも開発されており、ダウンロードして利用できます（geNorm、BestKeeperなど）。マイクロアレイによる発現プロファイルのデータがある場合には、その結果から類推することもできます。1種類のハウスキーピング遺伝子を用いるよりも信頼性は高くなりますが、非常に労力を要する方法です。

【Ribosomal RNA】

Ribosomal RNAが補正に用いられることもあります。28S rRNAと18S rRNAとでは、28S rRNAの方がmRNAの補正に適しているとされます。それは、mRNAが分解を受けた際、18S rRNAはインタクトな状態で残りやすく、mRNAの分解状態を反映しにくいからです。しかし、補正にrRNAを用いるには、いくつか問題点があります。まず、rRNAを転写するRNAポリメラーゼはmRNAのそれと異なるため、両者で発現の状態が異なっている可能性があります。そして、rRNAの存在量は、mRNAに比べて圧倒的に多いため、正確な補正ができるのか疑問です。また、rRNAにはpoly(A) tailがないので、oligo dTプライマーを用いる場合には、rRNAによる補正はできません。

【total RNA】

total RNAの量により補正する方法もありますが、濃度測定が正確に行われていることが前提です。また、total RNAに含まれるmRNAの量が一定とは限らず、そのようなことが保証できない実験系では適用できません。

6. 相対定量解析の手順

通常の遺伝子発現解析では、ハウスキーピング遺伝子の発現量によりRNA量を補正して、

目的遺伝子の発現量を相対定量します。ここでは、実験例を交えながら具体的な相対定量解析の手順を解説します。

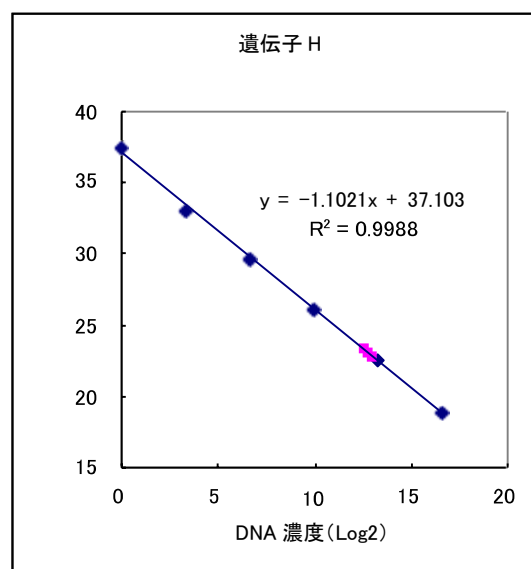
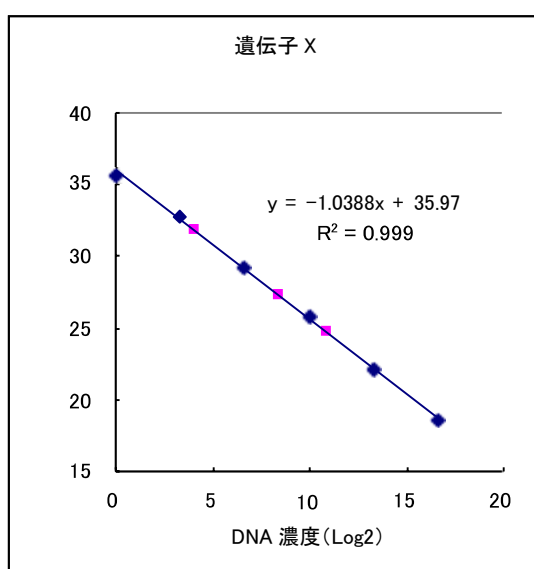
【モデル実験の内容】

3種類のRNAサンプル（A、B、C）について、“遺伝子 X”のmRNA発現量を比較します。また、ハウスキーピング遺伝子として“遺伝子 H”の測定も行います。

【相対定量解析例】

- ① 遺伝子Xと遺伝子Hのそれぞれについて6段階濃度のスタンダードを用いて検量線を作成し、そこに未知サンプルA、B、CのCt値を当てはめて初期鋳型量を算出します。（*1：定量結果）
- ② 鋳型として使用した3種類のtotal RNAサンプルは、mRNAの含量がそれぞれ異なる可能性があるため、ハウスキーピング遺伝子の発現量でmRNA量を補正します。具体的には、目的遺伝子（遺伝子 X）の定量結果をハウスキーピング遺伝子（遺伝子 H）の定量結果で割った値を求めればよいです。（*2：補正值）
- ③ 発現量の差を把握しやすいように、RNAサンプルA の発現量を“1”としたときの相対量で表します。（*3：相対量）

	遺伝子 X			遺伝子 H		
	既知量	Ct	定量結果* ¹	既知量	Ct	定量結果* ¹
スタンダード 1	1	35.66	-	1	37.46	-
スタンダード 2	10	32.77	-	10	33.06	-
スタンダード 3	100	29.20	-	100	29.69	-
スタンダード 4	1000	25.75	-	1000	26.10	-
スタンダード 5	10000	22.06	-	10000	22.51	-
スタンダード 6	100000	18.62	-	100000	18.88	-
RNA サンプル A	-	27.22	343.4	-	23.17	6391.5
RNA サンプル B	-	31.70	17.3	-	22.70	8589.7
RNA サンプル C	-	24.62	1946.1	-	22.93	7432.9



品	遺伝子 H		遺伝子 X	
	定量結果* ¹	定量結果* ¹	補正值* ²	相対量* ³
RNA サンプル A	6391.5	343.4	0.0537	1.000
RNA サンプル B	8589.7	17.3	0.0020	0.037
RNA サンプル C	7432.9	1946.1	0.2618	4.874

実験例では、相対定量の結果から目的遺伝子 Xは、サンプル A を“1”とした場合、サンプル B、C ではそれぞれ“0.037”、“4.874”に発現量が増減していることが分かりました。このように、相対定量は、同一遺伝子の発現量を異なるサンプル間で比較する方法であり、逆に、異なる遺伝子が同一サンプル内でどのような量比で発現しているかを正確に求めることはできません。相対定量で比較できるものとできないものをよく理解しておくことが重要です。

マルチプレックス PCR による遺伝子発現解析

遺伝子発現解析をマルチプレックス PCR で行う場合、必ず 1 本のチューブ内でターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を同時検出するように組み合わせます。例えば、3 種類のターゲット遺伝子 A、B、C を解析する場合、以下ようになります。

【正しい組合せ】

チューブ①	ターゲット遺伝子 A & リファレンス遺伝子
チューブ②	ターゲット遺伝子 B & リファレンス遺伝子
チューブ③	ターゲット遺伝子 C & リファレンス遺伝子

【誤った組合せ】

チューブ①	ターゲット遺伝子 A & ターゲット遺伝子 B
チューブ②	ターゲット遺伝子 C & リファレンス遺伝子

正しい組合せでマルチプレックス PCR を行うと、まったく同一の鋳型からターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を検出できるので、鋳型の分注誤差の影響を小さく抑えることができます。なお、マルチプレックス PCR の利点として試薬や鋳型の節約が挙げられますが、解析する遺伝子数が多いほどそのような効果は薄れてきます。(すべてのチューブでリファレンス遺伝子の測定を行うため、リファレンス遺伝子検出用のプローブ使用量は、かえって大幅に増えます)。また、マルチプレックス PCR の系構築は、比較的難しい作業でもあり、マルチプレックス PCR は、汎用的な解析にはあまり適していません。

誤差範囲の計算方法

誤差範囲の計算方法は、解析手法（検量線法/ $\Delta\Delta Ct$ 法、シングル PCR/マルチプレックス PCR）によって異なります。シングルPCRの場合には、ターゲット遺伝子を測定したチューブとリファレンス遺伝子を測定したチューブとの間に対応関係がないため、個々の定量値を求めた段階で平均し標準偏差を求めます。マルチプレックスPCRでは、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を同一チューブで測定するため、対応関係が存在します。この場合には、リファレンス遺伝子の定量値でサンプル間の標準化を行った段階で平均し標準偏差を求めます。以後の相対定量解析で、平均値の除算や減算を行う際、標準偏差も専用の計算式に当てはめて演算します。計算方法の詳細は、User Bulletin #2 (Applied Biosystems社) が参考になります。

参考資料

- ・ <<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt1-3.pdf>>,
(最終確認日 : 2021 年 11 月 16 日).

(参考資料 2)

遺伝子関連検査・染色体検査の精度確保にかかる留意事項について

遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る基準について
遺伝子関連検査・染色体検査精度の確保のために設けるべき基準
※医療機関、衛生検査所等共通

1 遺伝子関連検査・染色体検査の責任者の配置
※原則、業務経験を有する医師または臨床検査技師。ただし、専門性・経験を勘案して他の職種の者が責任者になることを妨げない。

2 内部精度管理の実施、適切な研修の実施義務

3 外部精度管理調査の受検（代替方法（施設間における検査結果の相互確認）に係る努力義務）

その他、検査施設の第三者認定を取得をすること（ISO 15189の取得）を当面、勧奨することとする。

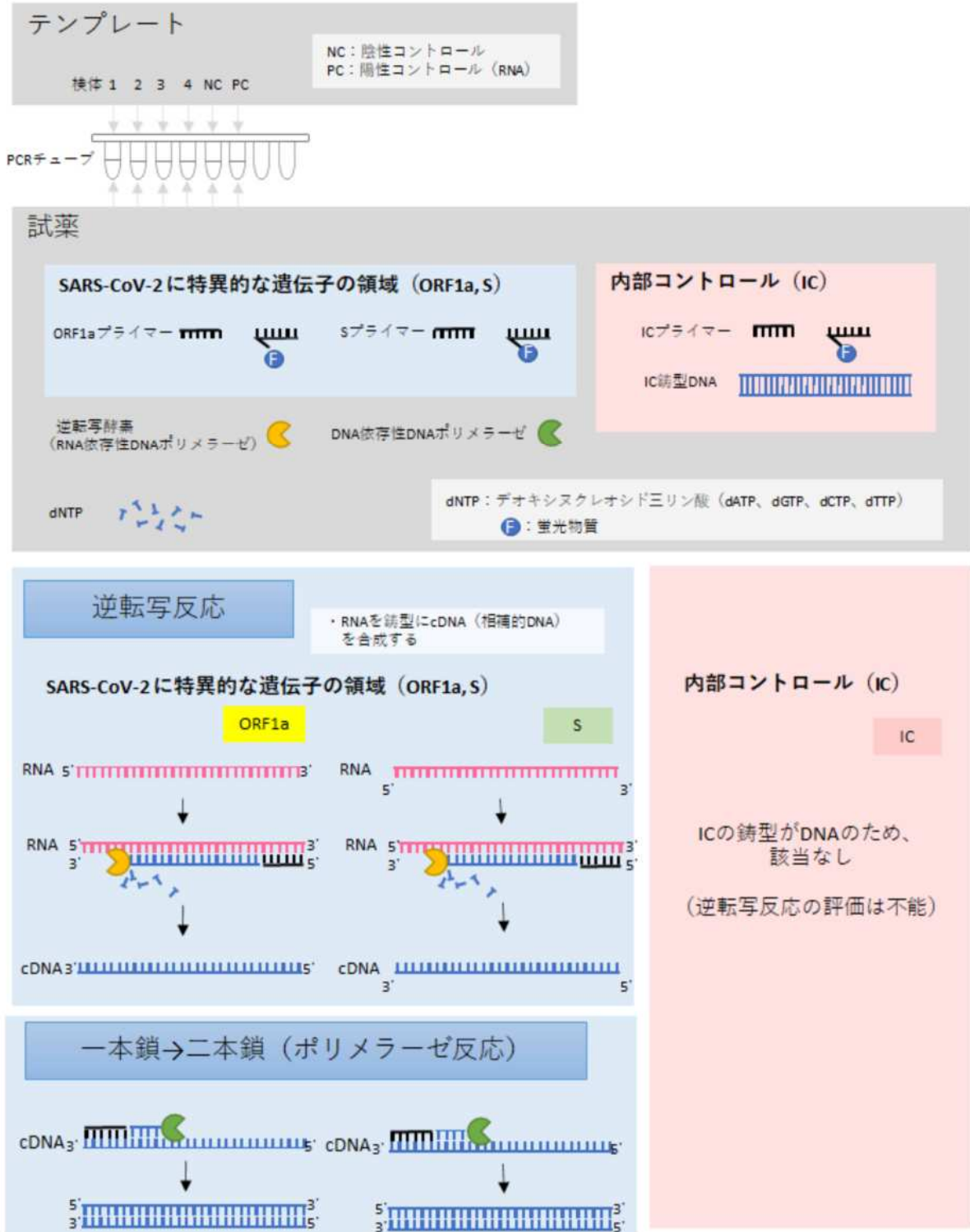
(出典) 厚生労働省 HP より。

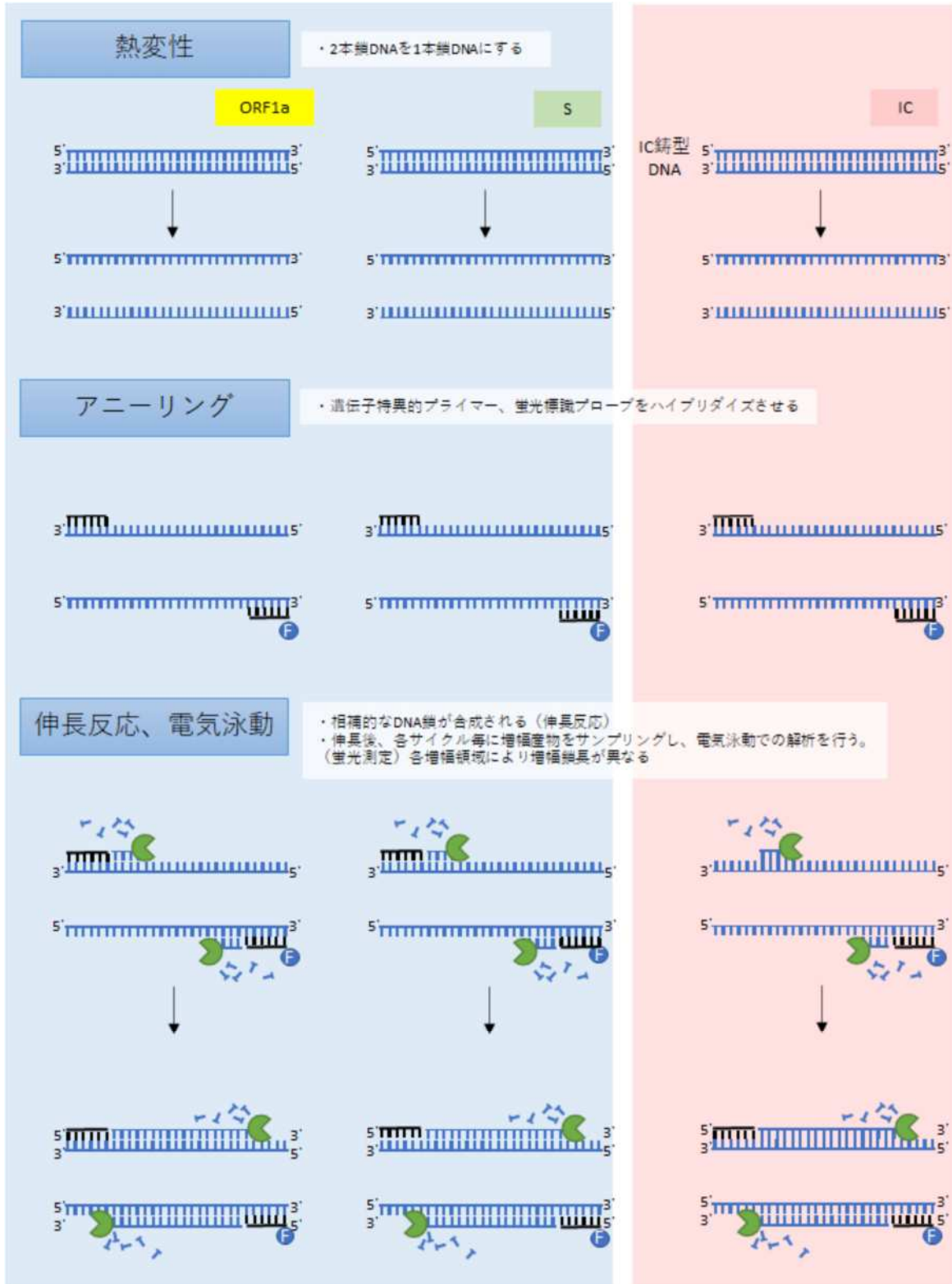
<<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402691.pdf>>,
 (最終確認、2021年11月17日)。

遺伝子関連検査では上記のように、責任者の配置（義務）、内部精度管理の実施と適切な研修の実施（義務）、外部精度管理調査の受検（努力義務）となっています。ISO15189などの第三者認定の取得は勧奨となっています。一方、検査室の遺伝子関連検査は必ずしも十分とは言えない状況で、厚生労働省の「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>（令和3年（2021年）8月13日）では、核酸増幅法は34品目が承認されています。抗原検査法は28品目が承認され合わせて62品目が実臨床では使用されています。このように多数の新型コロナウイルス感染症の体外診断用医薬品を臨床検査の現場で使用するためには、各施設が改正された医療法の趣旨をよく理解して検査を実施する必要があります。

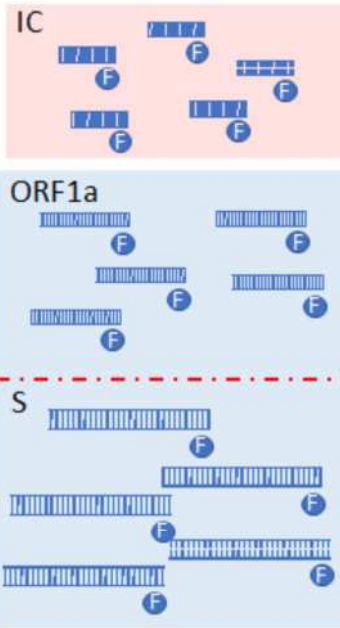
(参考資料 3)

SARS-CoV-2におけるRT-PCR-CEの原理と判定について

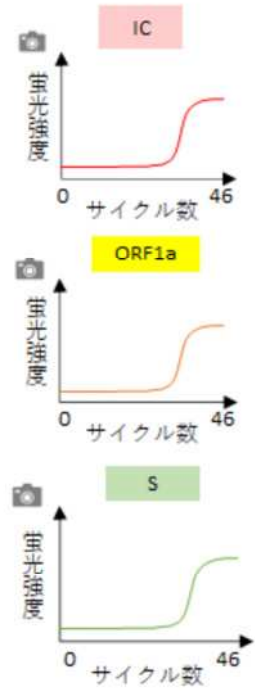
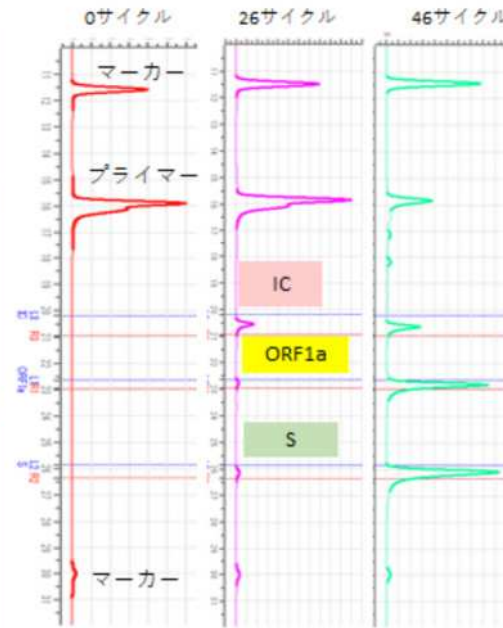




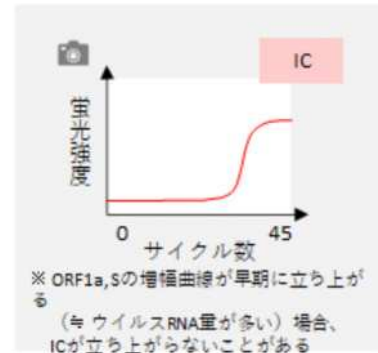
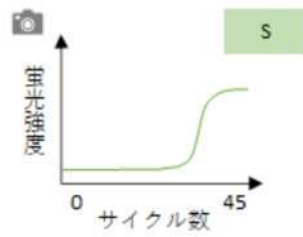
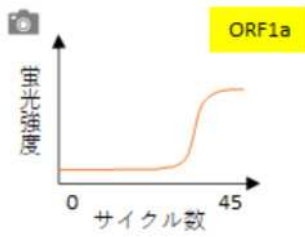
泳動結果



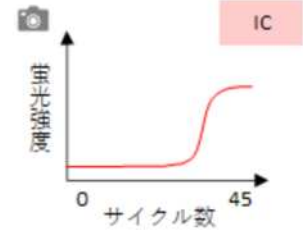
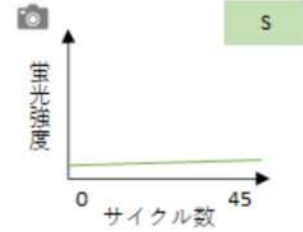
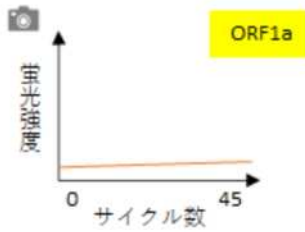
・各サイクルにおける電気泳動の解析が行われ、各増幅領域（増幅領域が異なる）のPCRサイクル毎に増幅シグナルがモニターされ、増幅曲線が作成される



陽性



陰性



(参考資料 4)

新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令等の一部改正について

感染症法における「感染症の分類」は疾病の分類であり、「病原体の分類」ではありません。これは医師（医療関係者）等が感染者を取り扱う時のための分類となります。病原体の「SARS-CoV-2」と、その感染症である「COVID-19」は同義ではないことの実理解が必要です。新型コロナウイルス感染症は、昨年「指定感染症」に指定されました。「指定感染症」は、暫定的な分類のため、2021年2月3日に「新型インフルエンザ等感染症」に再指定されました（下記）。2021年8月現在、SARS-CoV-2は四種病原体等に分類され、COVID-19は感染症法に基づく主な措置では新型インフルエンザ等感染症の取り扱いとなっています。感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律等の改正について（新型インフルエンザ等対策特別措置法等の一部を改正する法律関係）

新型インフルエンザ等対策特別措置法等の一部を改正する法律（令和3年法律第5号。以下「改正法」という。）が本日公布されたところ、これに伴い、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号。以下「感染症法」という。）及び検疫法（昭和26年法律第201号）の一部が改正され、令和3年2月13日に施行されることとなりました。

新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令等の一部改正について(案)

概要

- 今般、新型コロナウイルス感染症についてその感染の状況に鑑み、感染症法の枠組みにおいても、建物の立入制限等の措置や外出自粛等の要請等の更なる措置が可能となるよう(※)、所要の政令改正を行うこととする。
- また、生物テロ等の人為的な感染症の発生を防止するため、新型コロナウイルスについて、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成10年法律第114号。以下「感染症法」という。)上の病原体等管理における分類を定めることとする。

※新型コロナウイルス感染症は、新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令(令和2年政令第11号)において、「指定感染症」に指定(2/1施行)。また、同政令において、具体的に準用する感染症法上の規定についても定めている。

(参考)指定感染症：既に知られている感染性の疾病(一類感染症、二類感染症、三類感染症及び新型インフルエンザ等感染症を除く。)であって、感染症法上の規定の全部又は一部を準用しなければ、当該疾病のまん延により国民の生命及び健康に重大な影響を与えるおそれがあるものとして政令で定めるもの(感染症法第6条)

改正内容

1. 新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令(令和2年政令第11号)の一部改正

- 感染症法上の次の規定について、所要の読替えを行った上で、新型コロナウイルス感染症に適用することとする。
 - ・第31条 生活用水の使用制限
 - ・第32条 建物に係る措置(建物の立入制限等)
 - ・第33条 交通の制限又は遮断
 - ・第44条の2 実施する措置等に関する情報の公表
 - ・第44条の3 感染を防止するための協力(健康状態の報告、外出自粛等の要請)
 - ・第44条の5 都道府県による経過報告

2. 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行令(平成10年政令第420号)の一部改正

- 新型コロナウイルスについて、感染症法第6条第23項第11号の規定により政令で定める四種病原体等に追加する。

感染症法に基づく主な措置の概要(政令による準用の有無)				
	指定感染症	一類感染症	二類感染症	新型インフルエンザ等感染症
規定されている疾病名	新型コロナウイルス感染症	エボラ出血熱 ペスト ラッサ熱 等	結核 SARS 鳥インフルエンザ(H5N1) 等	新型インフルエンザ 再興型インフルエンザ
疾病名の規定方法	政令 具体的に適用する規定は、 感染症毎に政令で規定	法律	法律	法律 発動は厚生労働大臣による公表
疑似症患者への適用	○	○	○ (政令で定める感染症のみ)	○
無症状病原体保有者への適用	○	○	—	○
診断・死亡したときの医師による届出	○	○	○	○
獣医師の届出、動物の輸入に関する措置	—	○	○	○
患者情報等の定点把握	—	—	△ (一部の疑似症のみ)	—
積極的疫学調査の実施	○	○	○	○
健康診断受診の勧告・実施	○	○	○	○
就業制限	○	○	○	○
入院の勧告・措置	○	○	○	○
検体の収去・採取等	○	○	○	○
汚染された場所の消毒、物件の廃棄等、 死体の移動制限	○	○	○	○
ねずみ、昆虫等の駆除	○	○	○	△(※)
生活用水の使用制限	新たに適用	○	○	△(※)
建物の立入制限・封鎖、交通の制限	新たに適用	○	—	△(※)
発生・実施する措置等の公表	新たに適用	—	—	○
健康状態の報告、外出自粛等の要請	新たに適用	—	—	○
都道府県による経過報告	新たに適用	—	—	○

※ 感染症法44条の4に基づき政令が定められ、適用することとされた場合に限り、適用される。

黄：指定時に適用(2/1施行)

橙：改正時に適用(2/14施行)

桃：今回新たに適用

(参考) 規制の対象となる病原体等の分類の考え方

分類	規制	分類の考え方
一種病原体等	所持等の禁止	<ul style="list-style-type: none"> ・現在、我が国に存在していないもので、治療法が確立していないため、国民の生命に極めて重大な影響を与える病原体。 ・国際的にも規制する必要があるとされ、BSL4での取り扱いが必要。 ・原則、所持・輸入等を禁止するが、国又は政令で定める法人で厚生労働大臣が指定したものが、公益上必要な試験研究を行う場合に例外的に所持等を認める病原体等。
二種病原体等	所持等の許可	<ul style="list-style-type: none"> ・一種病原体等ほどの病原性は強くないが、国民の生命及び健康に重大な影響を与えるもの。 ・近年テロに実際に使用された病原体等が含まれる。 ・許可制により、検査・治療・試験研究の目的の所持・輸入を認めるもの。
三種病原体等	所持等の届出	<ul style="list-style-type: none"> ・二種病原体等ほどの病原性はない(死亡率は低い死亡しないわけではない。)が、場合により国民の生命・健康に影響を与えるため、人為的な感染症の発生を防止する観点から、届出対象として、その所持状況を常時把握する必要がある病原体等。 ・主に、四類感染症に分類される動物由来感染症の病原体が含まれる。
四種病原体等	基準の遵守	<ul style="list-style-type: none"> ・A型インフルエンザウイルスなど、病原体の保管・所持は可能であるが、国民の健康に与える影響を勘案して、人為的な感染症の発生を防止するため、保管等の基準の遵守を行う必要がある病原体等(我が国の衛生水準では、通常は死亡に至ることは考えられない病原体)。 ・所持者が使用、保管等の基準を遵守する必要がある病原体等。

平成18年厚生労働省資料より

感染症の範囲及び類型について。平成26年3月、厚生労働省健康局結核感染症課。資料3より引用。

参考文献

- 1) 「遺伝子関連検査の質保証体制についての見解」（一般社団法人日本衛生検査所協会遺伝子関連検査受託倫理審査委員会）。平成 25 年 5 月 23 日策定，平成 30 年 12 月 1 日改定，<<http://www.jrcla.or.jp/info/info/310315.pdf>>
- 2) 宮地勇人。「国内PCR等検査の精度管理と国際的な現状と方向性について」新型コロナウイルス感染症対策本部外国人観光客コロナウイルス対策PT。令和 2 年11月 6日（金）。
- 3) 「新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス」。公益社団法人日本臨床検査標準協議会，学術広告社。
- 4) 「SARS-CoV-2（新型コロナウイルス）核酸検出検査の体制の課題対応について」。日本臨床検査医学会，<<https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200413-1.pdf>>
- 5) 新型コロナウイルスについてー遺伝子検査での注意点ー。公益社団法人愛知県臨床検査技師会学術部遺伝子・染色体検査研究班。
- 6) 医療法改正等の経緯と検体検査の精度の確保に係る基準について。厚生労働省，<<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402691.pdf>>
- 7) 改正医療法施行規則（検体検査関連）平成 30 年 12 月 1 日施行。<<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402682.pdf>>
- 8) 日本臨床検査標準協議会（JCCLS），遺伝子関連検査標準化専門委員会。新型コロナウイルス核酸増幅検査の精度管理ガイダンス。日本臨床検査標準協議会 2021。P58。
- 9) 三宅一徳。臨床検査の偽陽性と偽陰性について。<<https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200427.pdf>>
- 10) 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針 第 4 版。2021 年 6 月 4 日，<<https://www.mhlw.go.jp/content/000790468.pdf>>
- 11) 東田修二。新型コロナウイルス検査の感度・特異度と結果報告の標準化。日臨検医学会誌 2021；69: 405-409。

- 12) 新型コロナウイルス感染症（変異株）への対応. 厚生労働省 新型コロナウイルス感染症対策推進本部,
<<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000793728.pdf>>

- 13) Ishige T, Murata S, Taniguchi T, et al. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. Clin Chim Acta 2020 ; 507:139-142.
doi: 10.1016/j.cca.2020.04.023. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32335089;
PMCID: PMC7179514.

- 14) Kageyama T, Ikeda K, Tanaka S, et al. Antibody responses to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine and their predictors among healthcare workers in a tertiary referral hospital in Japan. Clin Microbiol Infect, in press.

- 15) 認定 NPO 法人 21 世紀構想研究会
黒木登志夫先生から新型コロナウイルスに関するレポート,
<<https://www.kosoken.org/2021/02/%E9%BB%92%E6%9C%A8%E7%99%BB%E5%BF%97%E5%A4%AB%E5%85%88%E7%94%9F%E3%81%8B%E3%82%89%E3%81%AE%E3%83%AC%E3%83%9D%E3%83%BC%E3%83%88.html>>

おわりに

「はじめて新型コロナウイルス検査を行う方のために」は、日本遺伝子診療学会新型コロナウイルス感染症検査委員会の関係者が初めて SARS-CoV-2 核酸検査を臨床検査として手掛ける全国の初心者のために解説しました。2022 年 12 月現在、社会的にはワクチン接種を進めながらのウィズコロナの時代になりましたが、医療機関ではゼロコロナが求められています。医療関係者はこのようなウィズコロナとゼロコロナの狭間にあって、極限の努力を強いられているのが現状ではないでしょうか。今回の改訂では、一般的になりつつある SARS-CoV-2 核酸検査の情報の共有を目的としました。何かのお役に立てば執筆者一同、望外の喜びです。

2022 年 10 月までのその後の経過を追記します。

国内の「第 6 波」ではウイルスに多数の変異が入ったオミクロン株が主流となり、感染性の高さから、「第 5 波」までにワクチン接種や検査体制の整備が行われましたが、「第 5 波」に比較して感染者数や死亡者数が激増した。「第 6、7 波」では、オミクロン株などの変異解析も必要となり、今後の「第 8 波」以降のコロナビヨンドでは変異株の解析を含めた SARS-CoV-2 核酸検査体制のさらなる強化の重要性が高まっています。

I. 2021 年度全国検査部長・技師長会議資料より

第 68 回日本臨床検査医学会学術集会の前日に 2021 年度全国検査部長・技師長会議でも SARS-CoV-2 がテーマとして取り上げられ「ゲノム利用推進における病院検査部門の役割と課題」について以下のような議論がありました。

A. SARS-CoV-2 核酸検査

A-1. 精度管理実態調査の結果から（国内の大学病院検査部 94 施設から回答）

- ・様々な装置、試薬、手技の組合せが存在する。
- ・導入時の測定性能評価は約半数の施設であった。
- ・検査室の総合的な管理能力の違いが存在する。

精度管理については、CAP サーベイ、厚生労働省委託事業による EQA を行っている施設は約半数であった。

A-2. 検体は 97%の施設において鼻咽頭ぬぐい液であった。主に唾液を用いている施設は 23%であった。抗原定性検査は 54%の施設で実施されていた。抗原定量検査を行っている施設は 40%であり、33%の施設は鼻咽頭ぬぐい液を用いていた。

A-3. 夜間休日の緊急入院時において 69%の施設で PCR 検査を行っていた。夜間休日の緊急入院時において 93%の施設で鼻咽頭ぬぐい液を用いていた。78%の施設で外部精度管理を受検していた。

A-4. 全国では 17 施設において NGS が導入されており、4 施設は SARS-CoV-2 遺伝子解析目的に新規に導入された。5 施設において NGS をコロナ禍後のがん・難病等の遺伝子解析検査を含めた検査部体制の構築に生かしたいと思うと回答した。40%の施設で

特定の変異部位のみ PCR を用いて解析していた。今後の課題として大きく、精度管理、機種が多様性、対社会への説明責任、人材育成、NGS の普及とポストコロナへの活用に分けられた。

II. 改訂版 (2023.1) のまとめ

- 1) 新型コロナウイルス感染症の核酸検査の精度管理、機種が多様性、対社会への正確な情報提供、人材育成などに課題がある。特にポストコロナへの対応として核酸増幅検査や NGS 検査の技術の標準化および普及とゲノム医療への繋げ方を早急に具体化する必要がある。そのためには学会等を通して国内の病院検査室間の連携が必要である。分子生物学の素養を持つ臨床検査技師の育成も喫緊の課題である。
- 2) 検査の標準化および新興感染症への対策強化の 2 点が重要。前者は検査室と学会において、後者は国策として取り組まれる事項であり、両者の連携が重要である。
- 3) 外部委託検査では、出検や報告書の受領といった窓口業務がメインとなっている現状から検査室が関与しようというモチベーションにつなげていない。また体細胞遺伝子検査でも院内検査室の検査プロセス自体の空洞化が危惧されるという意見もある。特に生殖細胞系列の遺伝子検査においては、検体検査部門の関与が十分ではなく、改正医療法の観点からは是正が必要である。本分野における検査体制は過渡期であると考えられる。
- 4) 遺伝子関連検査の精度管理、質の保証、教育、プロセスを臨床検査として行う。ISO15189 の考え方 (分析前、分析、分析後プロセスの精度保証) は NGS にも応用が可能である。エキスパートパネルに臨床検査医 (検査専門医)、臨床検査技師 (検体) を施設要件に加えることを要望する。
- 5) NGS などの高度な検査には大学院教育、英文読解力、遺伝子関連検査に対する興味の持続が重要。生殖細胞系列遺伝子検査では費用対効果、保険収載の有無、2 次所見の理解、複数の診療科の協力が必要。
- 6) 今後のゲノム医療では院内化が検討されている。そのためアカデミア (病院、研究所)、解析センター (国内)、登録衛生検査所、検体検査部門との協働と役割分担の議論が必要である。

以上の内容は議論にとどめずに早急に具体的なアクションにつなげる必要がある。SARS-Cov-2 遺伝子関連検査の迅速・正確な結果報告、保険診療の運用、検査精度確保 (検査感度・検出限界、診断感度) には臨床検査医、臨床検査技師の関与が必要である。SARS-Cov-2 遺伝子関連検査の経験を体細胞遺伝子、生殖細胞系列遺伝子検査に発展させるには、検査部、病理部、認定遺伝カウンセラー[®]などの協働が求められる。外部精度管理調査 (EQA) には、同一検体を用いた施設間の協力体制が求められる。

<<https://www.jslm.org/about/zenkoku/index.html>>

<<https://www.jslm.org/about/zenkoku/20211111.pdf>>

なお、本解説書の内容を引用する場合は、「日本遺伝子診療学会 新型コロナウイルス感

染症委員会」からの引用であることを明記していただけますと幸いです。お気づきの点があれば、お気兼ねなく日本遺伝子診療学会新型コロナウイルス検査委員会（松下一之：kensa@office.chiba-u.jp）までご連絡をお願いします。

2023年1月吉日
日本遺伝子診療学会新型コロナウイルス検査委員会委員長
千葉大学医学部病院検査部 松下一之