

日本臨床衛生検査技師会における遺伝子検査の精度確保への取り組み  
～外部精度管理調査、品質保証施設認証および認定臨床検査技師制度の現状と今後の展望～

研究協力者 長沢光章（一般社団法人日本臨床衛生検査技師会）

## 要旨

一般社団法人日本臨床衛生検査技師会（日臨技）が取り組んでいる遺伝子検査部門の外部精度管理調査を中心に、品質保証施設認証および認定技師制度も含めた現状と今後の展望について報告した。2022（令和4）年から本格導入した SARS-CoV-2 遺伝子核酸増幅検査項目には、約 1,500 施設が参加した。今回のサーベイでは、34 種の核酸増幅・検出用試薬、32 種の核酸増幅・検出機器類が用いられ、その組合せから検出方法は 71 通りであった。その結果、殆どの施設では正答であったが、一部の施設で試料の必要以上の希釈やコンタミネーションなどにより誤答があった。アンケートより、陰性コントロールの測定が実施されたのは 67.1%、陽性コントロールの測定実施も 79.4%で、未実施の施設が 20～30%もあった。誤答の要因として、作成した試料が核酸増幅・検出用試薬の増幅域の差異や干渉も示唆された。また、体細胞遺伝子検査の外部精度管理評価の実現に向けた調査モデルを確立することを目的として、プレパイロットを実施した。その結果、目的とする腫瘍細胞の培養細胞株でセルブロックを作製し、FFPE 切片とした試料を配布する調査を実施するために、細胞株の入手から FFPE 切片作製を安定確保するまでの検証については、概ね良好な結果であったが、施設での測定および試料回収の温度や中央測定項目における結果は測定値にバラツキがみられ、配布する試料の量を増やす必要が指摘された。また、培養細胞の固定作業を行える環境、セルブロックの質の評価を含め、母数を広げたパイロット調査を重ねる必要があると考えられた。

その他に、日臨技が従来から実施している精度保証施設認証に加え、検体採取を含めた検査工程の全てを範囲とした品質保証を第 3 者機関として保証する新たに設立した品質保証施設認証および遺伝子検査部門の認定臨床検査技師制度の現状と課題について記述した。

## A. 背景および目的

2018（平成 30）年 12 月 1 日より施行された医療法等の一部を改正する法律（平成 29 年法律第 57 号）の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令（平成 30 年厚生労働省令第 93 号）によって、全ての医療機関において「検体検査の精度の確保」に関する基準が設けられたことにより、検体検査の精度管理状況について適切に管理されなければならないことが、法律上明確に位置付けられた。

一般社団法人日本臨床衛生検査技師会（日臨技）は、臨床検査の外部精度評価を実施する機関として、当事業を通じて会員施設のみならず全国のすべての検査室の検査精度の向上を目指している。現在、全国から 4,500 施設を超える受検がある「日臨技臨床検査精度管理調査」は、10 部門（臨床化学、免疫血清、血液、一般、微生物、細胞、輸血、病理、遺伝子、生理検査）について、各施設が自ら実施している検査項目について評価している。そして、臨床検査法に関する誤差要因の解明や精度向上につながる各種の提言など多くの実績を残しており、内外からも評価されて

いるところである。募集対象施設は、一般診療所、衛生検査所、病院等と幅広く対象とし、今後は今まで参加の少ない一般診療所に向けても受検を促す広報活動を予定している。また、都道府県臨床検査技師会や都道府県医師会が実施している精度管理評価とも連携し、データ標準化に向けて安定した質の高い標準物質の継続確保も目指している。更に、時代とともに日々進歩する医療の進歩に合わせて、新しい臨床検査項目について早期に精度評価ができるよう調査システムならびに精度管理物質の開発を行ってきた。特に、遺伝子検査部門では長年にわたり結核菌と肝炎（HCV および HBV）の感染症項目を実施してきたが、昨年度から SARS-CoV-2 遺伝子核酸増幅を調査項目として加え、体細胞遺伝子についても導入に向け取り組んでいる。

また、外部精度評価の他に日臨技では「品質保証施設認証制度（旧 精度保証施設認証）」および日本染色体遺伝子検査学会と合同で「認定臨床染色体遺伝子検査師制度」を創設している。品質保証施設認証制度は、精度管理事業および標準化事業に積極的に参加し、その施設における検査データが標準化に基づいたものであり、かつその精度が是正・改善を通じて十分保証されていると評価できる施設を、品質が保証された施設として認証する制度である。認定臨床染色体遺伝子検査師制度は、専門知識および高度な技術に対応できる検査者を育成し、染色体遺伝子検査の精度保証をすることなどを目的にした制度である。

今回、日臨技が取り組んでいる遺伝子検査部門の外部精度管理調査を中心に、品質保証施設認証および認定技師制度も含めた現状と今後の展望について報告する。

## B. 日臨技臨床検査精度管理調査における遺伝子検査部門について

遺伝子検査部門においては、長年にわたり結核菌と肝炎（HCV および HBV）の感染症項目を実施してきたが、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い SARS-CoV-2 遺伝子核酸増幅検査項目について 2021（令和 3）年にトライアル調査として実施し、2022（令和 4）年より本格導入した。また、体細胞遺伝子および染色体に関する精度管理評価については実施できていなかったが、2018（平成 30）年より「体細胞遺伝子検査の精度管理調査に向けた検討」についてのワーキングを立ち上げてパイロット調査を始めている。今回は、SARS-CoV-2 遺伝子核酸増幅検査および体細胞遺伝子検査について報告する。

### I. SARS-CoV-2 遺伝子核酸増幅検査

#### 1. サーベイ項目および試料内容

SARS-CoV-2 は合成 RNA（デルタ株、B.1.617.2）による精製核酸とし、サーベイ構成は 3 試料（各容量は 50  $\mu$ L）で、試料 A は陽性（500 コピー/ $\mu$ L）、試料 B は陰性、試料 C は陽性（100 コピー/ $\mu$ L）とした。合成 RNA は SARS-CoV-2 の全ゲノムをカバーするため 6 つのフラグメントから構成され、実検体に見立てるためヒトゲノム DNA や、RNA を保護するための保護剤や TE バッファー等を試料中に添加した。

#### 2. SARS-CoV-2 核酸増幅サーベイの実施工程

一般的な遺伝子検査の工程は①核酸抽出（精製）、②核酸増幅・検出からなる。今回の SARS-CoV-2 核酸増幅サーベイは②からの実施となるが、①と②が一連の全自動機器等では①からの実施となる。この場合はサーベイ試料が 50  $\mu$ L の精製核酸のため、使用機器に見合った容量になる

ようにボリュームアップを図る必要がある。その際の希釈液は添付の滅菌済みリン酸緩衝液あるいはメーカー推奨の希釈液、ウイルス輸送培地（VTM/UTM）等が該当する。また、参加施設の増幅過程を把握するため Ct 値あるいは Tt 値を求めた（表示可能な機器のみ）。

### 3. 参加施設数

参加は 1,485 施設であった。

### 4. SARS-CoV-2 核酸増幅・検出用試薬と機器

今回のサーベイでは、34 種の核酸増幅・検出用試薬（表 1）、32 種の核酸増幅・検出機器類（表 2）が用いられ、その組み合わせから検出方法は 71 通りに及んだ。増幅原理ごとに参加施設数をみると RT-PCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）が 1,090 施設（73.4%）で最も多く、以下 LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）が 169 施設（11.4%）、TRC（Transcription Reverse-transcription Concerted reaction）が 116 施設（7.8%）、NEAR（Nicking Endonuclease Amplification Reaction）が 106 施設（7.1%）、TMA（Transcription Mediated Amplification）と PCR/SmartAmp が共に 2 施設（0.1%）であった。機器類については、Gene Xpert/ベックマンが最も多く 256 施設（17.2%）で用いられ、以下 Smart Gene/ミズホメディー（Smart Gene 法）が 190 施設（12.8%）、Loopamp EXIA/栄研化学が 167 施設（11.2%）、TRCReady-80/東ソーが 116 施設（7.8%）、ID NOW/アボットジャパンが 106 施設（7.1%）、GENECUBE/東洋紡が 90 施設（6.1%）、CFX96 Touch シリーズ/バイオラッドが 69 施設（4.6%）、AutoAmp/島津が 66 施設（4.4%）、アプライドバイオ QuantStudio シリーズ/サーモフィッシャーが 50 施設（3.4%）などであった。

### 5. コントロール試料の活用の有無

#### 1) 陰性コントロール使用の有無とその種類

サーベイ試料の測定前（時）に陰性コントロールの測定が実施されたのは 1,485 施設中 997 施設（67.1%）で、未実施が 484 施設（32.6%）、未回答が 4 施設（0.3%）であった（表 3-1）。陰性コントロールの種類（複数使用含む）については、最も多いのがキット添付の陰性コントロールで 570 施設（57.1%）、以下 PCR グレード滅菌水が 217 施設（21.7%）、市販の陰性コントロール溶液が 62 施設（6.2%）、PCR グレード緩衝液が 37 施設（3.7%）、検体抽出液が 36 施設（3.6%）、滅菌生理食塩水が 27 施設（2.7%）、未使用の滅菌スワブが 18 施設（1.8%）、患者由来陰性検体が 16 施設（1.6%）、市販の陰性ヒトゲノムが 12 施設（1.2%）、ウイルス輸送培地が 4 施設（0.4%）であった（表 3-2）。

#### 2) 陽性コントロールの使用有無とその種類

サーベイ試料の測定前（時）に陽性コントロールの測定が実施されたのは 1,485 施設中 1,179 施設（79.4%）で、未実施が 304 施設（20.5%）、未回答が 2 施設（0.1%）であった（表 4-1）。陽性コントロールの種類（複数使用含む）で最も多いのが、陰性コントロールの使用時と同様にキット添付の陽性コントロールで 844 施設（71.3%）、以下市販の陽性ゲノム（コントロール）が 310 施設（26.2%）、患者由来陽性検体が 21 施設（1.8%）、キット内のスタンダード RNA が 4 施設（0.3%）、感染研提供の RNA が 3 施設（0.2%）、プラスミド DNA が 1 施設であった（表 4-2）。

表 1. 参加施設の SARS-CoV-2 (SC2) 核酸増幅・検出試薬一覧

増幅原理	核酸増幅・検出用試薬 / メーカー	参加数 (%)
RT-PCR	Xpert Xpress SC2「セフィエト」/ヘックマンコールター	256 (17.2)
〃	スマートジーン SC2 核酸キット / ミズホメディー	190 (12.8)
〃	Ampdirect2019-nCoV 検出キット / 島津	159 (10.7)
〃	ジーンキューブ HQ SC2 / 東洋紡	87 ( 5.9)
〃	Takara SC2 ダイレクト PCR(Direct Detection 含)kit/タカラバイオ	83 ( 5.6)
〃	SC2 Detection Kit -Multi- / 東洋紡	61 ( 4.1)
〃	ミュータスワコー SC2 / 富士フイルム和光純薬	47 ( 3.2)
〃	BD SC2 関連 (Flu 含) / ベクトンディッキンソン	43 ( 2.9)
〃	LeaDEA VIASURE SC2 PCR kit / プレシジョンシステムサイエンス	35 ( 2.4)
〃	FilmArray 呼吸器パネル 2・1 / ビオメリュー	24 ( 1.6)
〃	コハス Liat SC2 & Flu A/B / ロシュ・ダイアグノスティックス	20 ( 1.3)
〃	LightMix Modular SC2 E-gene / ロシュ・ダイアグノスティックス	19 ( 1.3)
〃	コハス SC2 & Flu A/B / ロシュ・ダイアグノスティックス	17 ( 1.1)
〃	TRexGene SC2 検出キット / 東洋紡	12 ( 0.8)
〃	One Step Prime III RT-qPCR kit / タカラバイオ	7 ( 0.5)
〃	TaqPath SC2 リアルタイム PCR 関連 / サーマフィッシャー	5 ( 0.3)
〃	エリート MGB SC2 PCR 検出 kit / プレシジョンシステムサイエンス	4 ( 0.3)
〃	TaqMan Fast Virus 1-step Master 関連 / サーマフィッシャー	4 ( 0.3)
〃	THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR kit / 東洋紡	3 ( 0.2)
〃	Direct RT-PCR kit SC2 / カネカ	2 ( 0.1)
〃	SUDx-SC2 検出キット / ステイツクスバイオテック	2 ( 0.1)
〃	SGNP nCoV PCR 検出キット / ステイツクスバイオテック	2 ( 0.1)
〃	DetectAmp SC2 RT-PCR kit / シスメックス	2 ( 0.1)
〃	Alinity m システム SC2 / アボットジャパン	2 ( 0.1)
〃	AgPath ID One-step RT-PCR kit / サーマフィッシャー	1 ( 0.1)
〃	SC2 GeneSoc N2 杏林 / 杏林製薬	1 ( 0.1)
〃	OneStep RT-PCR kit / キアゲン	1 ( 0.1)
〃	QuantiNova Multiplex RT-PCR kit / キアゲン	1 ( 0.1)
LAMP	Loopamp SC2 検出試薬キット / 栄研化学	168 (11.3)
〃	Genelyzer kit / キヤノンメディカル	1 ( 0.1)
TRC	TRCReady SC2 シリーズ / 東ソー	116 ( 7.8)
NEAR	ID NOW 新型コロナウイルス 2019 / アボットダイアグノスティックス	106 ( 7.1)
TMA	アプティマ SC2 / ホロジックジャパン	2 ( 0.1)
PCR/SmartAmp	SmartAmp 新型コロナウイルス PCR 検出キット / ダナフォーム	2 ( 0.1)
合 計		1,485

表 2. 参加施設の核酸増幅・検出機器類一覧

核酸増幅・検出機器 / メーカー	参加数 (%)
Gene Xpert / ベックマンコルター	256 (17.2)
Smart Gene / ミズホメディー	190 (12.8)
Loopamp EXIA / 栄研化学	167 (11.2)
TRCReady-80 / 東ソー	116 ( 7.8)
ID NOW / アホットジャパン	106 ( 7.1)
GENECUBE / 東洋紡	90 ( 6.1)
CFX96 Touch シリーズ / ハイオラット	69 ( 4.6)
AutoAmp / 島津	66 ( 4.4)
アプライトバイオ QuantStudio シリーズ / サーマフィッシャー	50 ( 3.4)
LightCycler シリーズ / ロシュ・ダイアグノスティックス	47 ( 3.2)
コバス Z480 / ロシュ・ダイアグノスティックス	47 ( 3.2)
ミュータスワコー g1 / 富士フイルム和光純薬	47 ( 3.2)
BD MAX / ベクトンディッキンソン	44 ( 3.0)
ジーンリードエイト / プレシジョンシステムサイエンス	34 ( 2.3)
CronoSTAR シリーズ / タカラバイオ	33 ( 2.2)
Thermal Cycler Dice シリーズ / タカラバイオ	26 ( 1.8)
FilmArray システムシリーズ / ヒオメリュー	24 ( 1.6)
コバス Liat / ロシュ・ダイアグノスティックス	20 ( 1.3)
コバス 6800/8800 / ロシュ・ダイアグノスティックス	17 ( 1.1)
アプライトバイオ 7500/7500F / サーマフィッシャー	7 ( 0.5)
エリートインジニアス / プレシジョンシステムサイエンス	5 ( 0.3)
アプライトバイオ StepOnePlus / サーマフィッシャー	4 ( 0.3)
MuSER / ステックスバイオテック	4 ( 0.3)
MyGo PRO / フナコン	4 ( 0.3)
Rotor-Gene Q / キアゲン	3 ( 0.2)
ハンサーシステム / ホロシックジャパン	2 ( 0.1)
Simprova / 栄研化学	1 ( 0.1)
AriaMx / アジレント・テクノロジー	1 ( 0.1)
Alinity m システム / アホットジャパン	1 ( 0.1)
GeneSoc / 杏林製薬	1 ( 0.1)
Genelyzer F III / キヤノンメディカル	1 ( 0.1)
Pico Gene PCR 1100 / 日本板硝子	1 ( 0.1)
合 計	1,485

表 3-1. 陰性コントロール使用の有無

陰性コントロール使用の有無	施設数 (%)
使用有	997 (67.1)
使用無	484 (32.6)
未回答	4 (0.3)

表 3-2. 陰性コントロールの種類

陰性コントロールの種類	施設数 (%)
キット添付の陰性コントロール	570 (57.1)
PCR グレード滅菌水	217 (21.7)
市販の陰性コントロール溶液	62 (6.2)
PCR グレード緩衝液	37 (3.7)
検体抽出液	36 (3.6)
滅菌生理食塩水	27 (2.7)
未使用の滅菌スワブ	18 (1.8)
患者由来陰性検体	16 (1.6)
市販の陰性ヒトゲノム	12 (1.2)
ウイルス輸送培地	4 (0.4)

表 4-1. 陽性コントロールの使用の有無

陽性コントロール使用の有無	施設数 (%)
使用有	1,179 (79.4)
使用無	304 (20.5)
未回答	2 (0.1)

表 4-2. 陽性コントロールの種類

陽性コントロールの種類	施設数 (%)
キット添付の陽性コントロール	844 (71.3)
市販の陽性ゲノム(コントロール)	310 (26.2)
患者由来陽性検体	21 (1.8)
キット内のスタンダード RNA	4 (0.3)
感染研提供の RNA	3 (0.2)
プラスミド DNA	1 (0.1)

## 6. 成績

### 1) 定性結果

1,485 施設からの回答について集計した。濃度が 500 コピー/ $\mu$ L の試料 A の正答数 (率) は 1,475 施設 (99.3%) であった。また、陰性の試料 B と濃度が 100 コピー/ $\mu$ L の試料 C の正答数 (率) はそれぞれ 1,475 施設 (99.5%) と 1,463 施設 (98.7%) であった。試料 A、B および C の 3 試料すべての正答数 (率) は 1,453 施設 (97.8%) であった。3 試料中、試料 C のみ誤答したのは 13 施設 (0.9%) で、原因は測定に供する試料の必要以上の希釈が考えられる。試料 C に加え、試料 A までもが誤答したのは 5 施設 (0.3%) であり、精製核酸が増幅できないレベルでの過度の試料の希釈が考えられ、その結果陽性 2 試料が陰転化したものと推測される。一方、試料 B のみ誤答したのは 6 施設 (0.4%) で、陰性試料が陽転化した原因として試料採取時のコンタミネーションが考えられる。

### 2) 核酸増幅・検出用試薬の増幅域の差異

N1 および N2 などの N 領域の増幅については、国立感染症研究所と米国 CDC において標的部位が異なっていることや各メーカー間で相違があることから、表記上 N 領域とした。SARS-CoV-2 の全ゲノムは約 3 万塩基長で、増幅域は ORF1a、RdRp、ORF1ab、ORF1b、ORF8、M、S、N で、その中では N1 と N2 を含め複数域をターゲットにした試薬が多い傾向にあった。陽性試料 A および C では各試薬ともほぼ増幅域の反応性がみられたが、コバス SC2&Flu A/B では E 領域のみの増幅で、ORF1ab 領域は増幅が認められなかった。サーベイ試料は SARS-CoV-2 の全ゲノムをカバーするのに 6 つの合成 RNA のフラグメントが用いられている。ORF1ab 間は全ゲノムの約 7 割を占めることから、4~5 つのフラグメントで構成され、プライマーが切断点をまたぐように設計されている場合には増幅されない可能性があることも ORF1ab 領域の増幅が認められない要因の 1 つと考えられる。コバス SC2&Flu A/B 以外の ORF1ab を標的とした核酸増幅・検出用試薬では増幅が認められている。

### 3) 試料と核酸増幅・検出用試薬の干渉

SARS-CoV-2 核酸増幅サーベイ用試料として今回合成 RNA を用いた。試料中の合成 RNA を保護するため、保護剤や TE バッファー等が含まれているため、その中の物質がコバス Liat SC2 & Flu A/B/ロシュ・ダイアグノスティックス (コバス Liat 法) の内部コントロール成分と同一であったため、過剰量存在することで Ct 値が低下し過ぎて許容範囲を外れることでコバス Liat 法が測定不能 (無効判定) になったと考えられる。特にコバス Liat 法による試料 B の測定において参加全 20 施設で Invalid の結果であった。この現象はサーベイ試料を UTM で高倍率に希釈することで判定不能が回避されたことから試料中の物質が増幅反応に影響したことが示唆された。

また、Loopamp SC2 検出試薬キット/栄研化学において濁度検出による機器判定では問題はなかったが、蛍光検出 (目視) で反応前からすべての試料で発光する現象がみられた。LAMP (正確には RT-LAMP) 法による蛍光検出の原理は、反応前の試薬内の蛍光物質カルセインは Mn イオンと結合して消光状態であるが、反応後は反応副産物のピロリン酸イオンが Mn イオンを奪うことで蛍光発光することになる。今回の反応前からの蛍光発光は試料中の TE Buffer に含まれる EDTA が Mn イオンをキレートし、その結果蛍光物質カルセインがフリーとなったことで発光に及んだと考えられた。目視による蛍光検出は機器による濁度判定後に確認として実施されること

から、今回の LAMP 法による回答は通常の濁度による判定が採用されていた。なお、同様に LAMP を増幅原理とした蛍光インターカレーター検出方式による Genelyzer kit/キャノンメディカルでは蛍光反応様式が異なることから検体との干渉は見られていない。

#### 4) 遺伝子検査における Ct 値および Tt 値の分布

今回、Ct 値が得られるリアルタイム RT-PCR の試薬と機器の組み合わせ（コバス Liat 法を除く）は 58 通りがあった。2 試料間の Ct 値では試料 A が C より高値となる施設はみられなかった。さらに 58 法の各平均 Ct 値を基にした集計上の全体平均 Ct 値はそれぞれ 27.94（最小：24.80、最大：37.68）と 30.71（最小：27.50、最大：39.53）であった。リアルタイム RT-PCR は 1 サイクルごとに 2 倍ずつ増幅するので、100 コピー/ $\mu$ L 濃度の試料 C と 500 コピー/ $\mu$ L 濃度の試料 A の間には理論上 PCR で言えば 2.32 サイクル数の差が生じることになる。サーベイ報告の Ct 値を検証した結果、試料 C と A の全体平均 Ct 値の差は 2.77 サイクル数となり、理論上の 2.33 サイクル数に近似していた。様々な SARS-CoV-2 遺伝子検査法が存在するなかで、試料中の標的核酸量とリアルタイム RT-PCR 法から得られた Ct 値は逆相関関係にあり、Ct 値が 30 付近ではある程度の定量性が保たれていることが確認できた。

一方、LAMP は鎖置換反応を利用して一定温度で増幅させる方法であるが、カオスな増幅方法であるため、PCR の様に定量的評価ができない。LAMP 法によるサーベイ結果から試料 A に対し試料 B の方が Tt 値は低い結果もみられた。

一般的に Ct 値が 30 から 35 以上に高くなるに従いウイルス量が減少し、感染性が低下する。Ct 値の増加や発症日からの日数の経過に伴いウイルス培養の陽性率が低下、すなわち感染性の低下が報告されている。遺伝子検査における Ct 値の活用については、国際的にも基準が統一されていない。さらに今回のサーベイ結果から、本邦でも測定に用いられた試薬によっては Ct 値の差異が生じることが明らかとなった。増幅に用いる核酸量、増幅効率、増幅試薬と核酸量のバランス、さらに核酸精製（抽出）する際の溶出液の容量（精製核酸の濃縮率）等が Ct 値の差異の要因と考えられる。

## II. 体細胞遺伝子検査の精度管理調査に向けた検討

日臨技が実施したアンケート（日臨技内部資料）によれば、4,422 施設（日臨技精度管理調査受検施設）のアンケートから、コンパニオン診断（CDx）を自らの施設において実施していると回答した施設が 154 施設（3.5%）、そのうち体細胞遺伝子検査を実施しているのが 100 施設、パネル検査にいたっては 45 施設の回答であった。NGS 法における結果の精度管理評価ではなく、NGS 法に供する前の抽出物の評価のみであれば、受検対象施設を広げることができると判断している。また、一般社団法人日本病理学会/NPO 法人日本病理精度保証機構（畑中佳奈子研究協力委員報告）で既に行っている腫瘍細胞含有割合の評価調査と併せて、各施設のパラフィン切片抽出物の評価も日臨技で実施できれば良いのではないかと考えている。日臨技では、そのために各施設に配布する試料の開発および安全な試料配布方法、結果改修・評価統計処理システムについて検討を行っている。

2019 年開始のがんゲノム医療では、病理検体の品質管理が重要であり、この点を含めた外部精度管理評価体制の構築が必要である。日臨技では、体細胞遺伝子検査の外部精度管理評価の実現

に向けた調査モデルを確立することを目的として、まずはプレパイロットを実施することとした。また、日臨技では、現在 NGS 法に用いられているホルマリン固定パラフィン包埋検体 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE、以下 FFPE 検体) に最も影響を与える固定操作について標準化を図るための「病理 FFPE 材料を前提とした固定液標準化検討ワーキング」を立ち上げ、病理組織標本を作製する医療機関と登録衛生検査所において作成基準の統一化を目指した議論も始めている。

## 1. 方法

### A. 2021 (令和 3) 年、日臨技で実施したパイロットスタディーの準備

#### 1) 精度管理用標準物質

- ① JCRB 細胞バンクより JCRB Lu-65 EGFR L858R 株と JCRB SK-BR3-Luc HER2 株の 2 細胞株を入手した。
- ② 凍結状態の培養細胞から大量培養を外部業者に委託した。
- ③ 各細胞を、ゲノム診療用病理検体取り扱い規定 (日本病理学会編) に則って、10%中性緩衝ホルマリン固定液にて 24 時間固定し、続いて FFPE セルブロック作製を外部業者に依頼した。

#### 2) LU65 細胞株情報

セルブロックの完成状況の確認として、WG 委員の 1 施設で、HE 染色ならび核酸抽出と EGFR 遺伝子変異解析を実施し、有用性の検証を行った。

### B. 2022 (令和 4) 年、プレパイロットスタディ実施

実施時期、内容、対象物、方法について具体的に検討した結果、コロナ禍の医療体制逼迫もあり、令和 4 年度は委員の 4 施設においてプレパイロットを実施することとした。

- 1) 時期は、令和 4 年 6 月とした。
- 2) 内容は、各施設で配布された FFPE リソースから、核酸抽出作業ならび濃度・純度を測定した data 抽出物を提出し、同時に抽出物は中央施設に送付した。
- 3) プレパイロットのリソースは、LU-65 細胞株の FFPE セルブロックを使用した。
- 4) 配布試料は、LU-65 細胞株セルブロック 2 種 (試料 A: ゲル固化法 FFPE セルブロック、試料 B: 遠心沈殿法 FFPE セルブロック) から、5  $\mu$ m 薄切切片 4 枚を載せた各 1 枚のプレパラートとした。
- 5) 配布先と方法は、WG 委員の所属する 4 施設に、薄切後 1 週間以内の標本をクール便で配送した。
- 6) 配布先の作業は、各施設の試薬、方法にて脱パラから核酸抽出、DNA 濃度・純度を測定した。また、条件調書 (アンケート用紙) に測定値と条件を記載し、温度を 3 条件 (常温、4°C、凍結) に分けて返送した。
- 7) 中央測定は、4 施設分すべてを中央測定施設にて測定し、集計した。
- 8) 各結果から精度管理手法の検証と課題の抽出を行った。

## 2. 結果と考察

- 1) 配送状況として、返送試料の温度は条件を逸脱していなかった
- 2) 試料 A は、溶解液で拡散が生じ、収量が落ちた。通常の FFPE と比較して技術的な差が

生じやすい傾向にあり、試料として適切か否かの検討が必要であった。

- 3) 4 施設の抽出方法、抽出試薬は全て異なっていた。
- 4) 各自施設の測定は、4 施設全てで得られた。
  - ① 中央測定では、3 手法の測定を行った。
  - ② 吸光度法 A260/A280 による検定では、配布施設での測定値（自施設と中央測定）に乖離はなかった。核酸収量は、各施設測定 2.7~20 ng/μL、中央測定（Nanodorop 法 11~63 ng/μL、Qbite 法 1.7~4.8 ng/μL）、純度は各施設測定 1.37~2.13 ng/μL、中央測定 1.7~4.8 ng/μL と施設間差を認めた。
  - ③ 搬送温度による差は認めなかった。一方、測定法 NanoDrop2000、Qubit3.0 においては、中央搬送時の温度に依存する測定値の変動（測定値上昇や測定不能）が見られたが、信頼度は不明であった。
  - ④ DIN 値（DNA Integrity Number）測定（中央測定のみ）では、施設間ならびに温度差は認められなかった。

以上の結果より、標準物質を培養細胞株セルブロック FFPE 切片とした入手から作製までの系検証については、概ね良好な結果であった。しかし、施設での測定および試料回収の温度や中央測定項目における結果は測定値にバラツキが見られ、情報量不足であり、中央測定を行うためには、配布する試料の量を増やす必要が指摘された。培養細胞の固定作業を行える環境も課題であり、セルブロックの質の評価を含め、母数を広げたパイロット調査を重ねる必要であると考えられた。今後は、配布試料の量を増やし、施設数を 15~20 程度増やしたパイロット調査を実施するよう準備を進めている。

### C. 品質保証施設認証制度について

日臨技は、2010（平成 2）年に精度保証施設認証制度を創設した。旧制度は、臨床化学および血液学の 2 部門について当会の外部精度管理調査に参加し、精度が十分保証されていると評価できる約 810 施設を認定していた。しかし、今回の医療法改正後、さらに診療、施設の実情に応じた精度管理の確保が求められ、施設認証制度のグレードアップが課題となっていた。検査・分析から検査値の確認を対象とした精度管理調査の範囲から、検体採取を含め検査工程の全てを範囲とした品質保証が必要で、それらを第 3 者機関として保証する制度も必要であった。そして、2022（令和 4）年に公益社団法人日本臨床検査標準協議会と共同で本認証制度を立ち上げた。

#### 1. 認証範囲

当会が主催している臨床検査精度管理調査事業で実施している項目のうち、施設が調査に参加している部門毎に認証を行うが、認証自体は施設で 1 認証のみとする。認証を実施する部門は臨床化学、血液、一般、免疫、微生物、輸血、細胞、生理、病理、遺伝子の 10 部門である。なお、認定期間は 2 年で、2 年ごとに改めて受審する。

#### 2. 認証基準の要求事項

認証基準は、1) ~5) に記載する要求事項を全て満たしていることとした。

- 1) 当会主催の外部精度管理調査への参加（連続して 2 年以上の参加）し、許容正解項目／参加項目の比率が一定以上の水準であること。

- 2) 当会主催の外部精度管理調査において、許容正解を外れた項目については、原因の究明、是正処置、監督者の確認等の対策がなされ、その記録があること。
  - 3) 検査の精度の確保に関する責任者が配備されていること
  - 4) 標準作業書、作業日誌並びに管理台帳の配備されていること
    - ①精度管理・標準化の積極的な実践、原則として施設内で標準化を行い、実践していること。
    - ②内部精度管理に関する記録が保管され、活用されていること
  - 5) 人的資源の確保
    - ①認証対象の検査室に、臨床検査技師が常勤していること。
    - ②精度管理に関する適切な研修の実施および人材育成(継続的な教育)がなされていること。
    - ③継続的に臨床検査の精度管理に関連する研修(研修会、報告会等)に年に1回以上参加していること。
  - 6) 当会の精度管理調査以外の外部精度管理調査に1件以上参加していることが望ましい。
3. 2022年度認定施設数

2022・2023年度の認定施設は240施設であり、そのうち遺伝子検査項目の認定は79施設であった。現在、2023・2024年度の認定施設について審査中である。

#### D. 認定臨床検査技師制度

##### 1. 目的

認定臨床検査技師制度は、臨床検査領域の進歩発展に対応した検査技師の資質の向上と生涯教育の充実をはかり、検査技師の認定に関する体制を整備し、各種検査を正確に実施する知識と技術を有し、後進の指導、育成ができる臨床検査技師の認定をもって、臨床検査の精度保証を通じ良質な医療を提供し、国民医療の向上に寄与することを目的としている。

##### 2. 種類

臨床検査技師の認定制度には、日臨技認定センター(日臨技と一部の専門学会)、日臨技+日本臨床検査医学会+日本臨床検査同学院+専門学会での協議会方式、各専門学会独自などの様々な認定臨床検査技師制度がある。その中で、遺伝子検査分野の認定制度には、①日臨技認定センターの認定臨床染色体遺伝子検査師制度(日臨技+日本染色体遺伝子検査学会)、②日本臨床検査同学院の遺伝子分析科学認定士(初級)および(一級)があり、全て5年間の更新制度を採用している。

##### 3. 取得者

遺伝子検査分野における認定技師の取得者は、①認定臨床染色体遺伝子検査師(遺伝子分野): 87名、②一級遺伝子分析科学認定士: 35名、③遺伝子分析科学認定士(初級): 1,729名であり、種類によってはかなりハードルが高い試験となっている。

#### E. まとめ

全国規模の当会の外部精度管理調査の遺伝子検査部門におけるSARS-CoV-2核酸検出項目の結果から、測定試薬・機器で最も高い検出感度が得られるように測定を進めるために、試料が不足する場合はメーカー推奨の希釈液を用い、最小限度の希釈にとどめ(あるいは増幅可能な精製核

酸濃度を保ち)、試薬・機器類の説明書に従い、検出感度や特性を十分理解したうえでの SARS-CoV-2 核酸増幅検査の実施が望まれる。

また、FFPE を用いたがんゲノム検査では、検体管理プロセス(検体採取-保存-搬送)が DNA の品質に大きく影響するところである。日本病理学会と日臨技等により設立された NPO 法人 日本病理精度保証機構(JPQAS)では、FFPE を用いたがんゲノム検査のための、DNA 品質や腫瘍含有割合についての外部精度評価を行っている。同機構における評価判定には臨床検査技師も技術的な評価に参加している。日本病理精度保証機構は、CAP を含む国際的な病理精度保証ネットワーク(International Quality Network for Pathology)のアカデミックメンバーであり、EQA に関する国際的な情報共有をすすめながら国内の現状に最適化した外部精度評価を進め、公益財団法人日本適合性認定協会が JAB RM300(2022 9th)において、機構が行う外部精度評価は JAB が認める技能試験として認められている。

本調査研究では、FFPE 検体の取扱いに関して、公益社団法人日本臨床検査標準協議会、一般社団法人日本臨床検査医学会、日本病理学会および日臨技が、その品質の確保に関して取扱い規程の策定や講習会を開催するなどの取り組みをすでに行っており、日臨技はそれら団体と同問題について情報を共有している。さらに外部精度評価として、日本病理精度保証機構においては FFPE 検体から抽出した DNA に関する外部精度評価を開始している。また、一般社団法人日本臨床検査振興協議会を中心に「遺伝子関連検査の質保証に関する基本的考え方、特に外部精度評価に関して」が提言されるなど、この方面での活発な動きがある。しかし、部分的に連携体制の構築は見られるものの全体的な体制構築には至っていない。

当会および日本臨床検査標準協議会と合同で立ち上げた品質保証施設認証制度は、2022(令和 4)年度から開始されたが、各施設により精度管理に対する取組み、考え方、実践が異なっており、申請書内容の不備も多く見受けられた。今後、内部精度管理方法、標準物質の制定や供給、是正方法などの標準化あるいは制定が不可欠と考えている。

現在、臨床検査室における認証制度として 2003(平成 15)年に制定された国際規格「ISO 15189(臨床検査室-品質と能力に関する特定要求事項)／公益財団法人日本適合性認定協会」があるが、この 20 年間で認定された施設は約 280 施設である。当会の臨床検査精度管理調査に参加している約 4,500 施設、そのうち遺伝子検査として SARS-CoV-2 核酸増幅検査を実施している施設は 1,500 施設以上あり、ISO1589 取得施設は 10 分の 1 以下に過ぎない。また、当会の精度保証施設認証または品質保証施設認証を取得している施設も約 700 施設に過ぎない。今後、各団体が協力し合い、最終的には法整備も視野に入れた取組みが不可欠と考える。

認定臨床検査技師の取得は、基本的に個人のスキル向上であって義務化されていない。しかし、日常業務において品質保証された検査結果を提供するためには必要な要素であり、今後、多くの臨床検査技師が取得を目指せる認定技師制度にするためのサポート体制が不可欠と考える。

以上、本厚生労働科学特別研究事業において、厚生労働省が主体となり、各関連団体が結束し統一的な基準値を設け、それに基づいた教育を施した人材の育成、ならびに設置基準をクリアした施設が増えることが望まれる。

## F. 参考文献

日本臨床衛生検査技師会：2022年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書．2022

## G. 研究共同協力

長沢光章（日本臨床衛生検査技師会 代表理事副会長／国際医療福祉大学大学院 教授）

滝野 寿（日本臨床衛生検査技師会 専務理事）

宮島喜文（日本臨床衛生検査技師会 代表理事会長）