

# 明日から使える精度管理 基礎から応用 ～自動分析装置から遺伝子関連検査まで～

座長

東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 教授

宮地 勇人 先生



## 講演 1

### 遺伝子関連検査に必要な基礎知識

演者

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

白神 博

#### 核酸の抽出および定量における品質管理

遺伝子関連検査は多岐にわたるなかで、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いた解析方法は従来から多用されているが、ゲル電気泳動による確認は定性的検査あるいは半定量的検査となる。最近では、リアルタイム定量 PCR 法を用い増幅される目的の遺伝子領域が検出されるサイクル数や目的遺伝子のコピー数を算出し、標準サンプルとの比較などにより遺伝子量を定量する方法が用いられている。このような PCR を用いた遺伝子関連検査において DNA や RNA などの核酸を扱う際に、目的とする核酸が適切に採取できているのか、あるいは陰性結果が出た場合に核酸抽出の失敗によるものなのか、もしくは臨床系特有の問題として検体由来の阻害による影響の可能性などを考慮することが精度管理において重要となる。

核酸抽出のステップについて考慮する項目としては、例えば造血器腫瘍を対象としている場合は RNA を解析するが、RNA はそのままの形状では PCR での増幅を行うことができないため、RNA を回収した後で逆転写反応を用いて complementary DNA (cDNA) 合成をしたのちに、PCR を行うのが一般的である。ただし、結果の判定は PCR 実施後となるため、理想的には RNA を回収した後に、量が十分であるか、もしくは品質に問題がないかという確認を実施するのが安心かつ検体の無駄を回避できるステップとなる。

実際の核酸抽出に関しては各種抽出キットが提供されてお

り、最近では磁性ビーズを用いた自動化装置もあり多検体にも迅速に対応できるようになった。用手法で簡単な精製方法の一例として、RNA や DNA を吸着するシリカメンブレンを用いた核酸抽出(精製)の方法が知られている。また、回収された Total RNA などの核酸の品質管理をする方法は Thermo Scientific™ NanoDrop™ 超微量分光計などを用いた吸光度測定が一般的に使用されている。260nm 波長における吸光度測定から算出される濃度により PCR などに十分な核酸量が回収できているか簡便に確認可能となる。また、核酸の品質については、吸光度測定に基づく 260nm と 280nm の吸光度の比率から推定することができ、一般的には核酸の場合には波形ピークが 260nm 付近にあること、また、280nm の数値の高さが 260nm の数値の約半分程度であり、260nm/280nm の比率が 2.0 付近であれば Total RNA の品質として良好であると考えられる(図 1)。

通常 PCR では、95℃程度まで加熱して DNA の 2 本鎖を 1 本鎖にした後、60℃付近まで温度を下げると、反応溶液中に大量に存在する目的遺伝子配列に特有なプライマーが対合する対象配列に先回りをして結合し、このプライマーを起点として目的遺伝子領域の増幅を実施し、電気泳動で増幅された遺伝子領域をバンドとして有無を確認する。検査キットを使用する場合はキット付属のプライマーを使用するが、検査室開発による検査(LDT)で実施する場合には自前で適切なプライマーを設計準備する必要がある。例えばフィラデルフィア転座で融合

遺伝子を検出する場合には、融合遺伝子の切断点をまたぐようにプライマーを設計する必要があり、この切断点は必ずしも1点ではなく若干変動する場合があるため、網羅的な切断点に対応できる箇所にプライマーを設定することが大事である。またプライマーの配列に依存して、類似の遺伝子配列に結合してしまう可能性があるため、できるだけ類似の遺伝子を回避できるように特異性が高いプライマーを設計することも重要となる。

PCR でも、使われる試薬やキットによって温度条件が異なるので、注意が必要となる。最近主流となっている Hot スタートタイプの酵素では室温では活性を持たないことから、分注作業中に冷却処理の必要がなく、非特異的な反応が低減できるメリットがある。逆に、活性化のための加熱時間の短縮や温度を変更すると、酵素の活性が十分に得られない可能性があるため、Hot スタートタイプの酵素では最初の加熱の温度と時間が非常に重要になる。

PCR での検出が問題なく稼働しているか確認するために、検査キット付属の陽性コントロールで確認することも可能だが、キット付属の陽性コントロールでは、装置や試薬準備に問題ないという担保にはなるが、患者からの検体採取や核酸品質に関するプロセスは判定できない。そのため、可能であれば1本のチューブの中で2つの遺伝子領域を増幅するマルチプレックス PCR を行うことが望ましい。患者から適切に核酸が採取できていたら必ず出る疾患に関連しない内在性コントロールである GAPDH 遺伝子の検出が可能か判断することで、検体から適切に RNA が抽出できているか、また、そのプロセスに問題ないか、臨床系特有の阻害などの増幅に影響する因子を検討確認できる。

## リアルタイム PCR 装置の特徴と品質管理への応用

リアルタイム PCR 装置は、機械の下半分が PCR 装置で、上半分が蛍光検出部で構成されており、LED 光源からの励起光により検出された蛍光をミラーで検出することで目的とする遺伝子領域の増幅をリアルタイムに確認することができる。目的の遺伝子の量が多ければ早い PCR サイクル数から光が検出

される一方で、検体に含まれている遺伝子が少ない場合には何回も PCR で増幅を実施しサイクル数が遅れて検出される。このような原理により、目的遺伝子の量を PCR サイクル数で厳密に定量することができる。

多くの臨床検体の場合は TaqMan™ プローブを使用したリアルタイム PCR で目的遺伝子を検出している。目的遺伝子特有の Forward プライマーと Reverse プライマーで目的の遺伝子領域を増幅しながら、その間に存在する特有の配列を TaqMan プローブで検出する。TaqMan プローブは分解されると光るという特性があり、遺伝子が増幅の際に目的配列が存在する TaqMan プローブは DNA ポリメラーゼにより分解されて蛍光が検出される。PCR を実施すると、サイクル初期には検出限界以下の光量で検出することはできないが、サイクルの途中から光が増加してくることが確認できるようになる。リアルタイム PCR は各サイクルで蛍光を検出しているため、何サイクルで蛍光が検出できたのかということで正確に定量ができる(図2)。

最近、がんゲノム医療に関連してホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体の品質管理をリアルタイム PCR で確認することが増えている。FFPE 検体では物理的な剪断により DNA や RNA が分解(切断)され、分光光度計などでは分解の程度を知ることができないため、リアルタイム PCR を応用した品質確認が行われることが多い。ヒト遺伝子では RNase P という遺伝子領域を対象として、87bp の非常に短い増幅産物および、領域をずらした 260bp 程度の少し長めの PCR 産物を増幅し比較を行う。DNA 分解が進んでいなければほぼ同等の検出ができるが、分解が進んでいる場合は短いものと長いもので増幅のサイクル数に差 ( $\Delta Ct$  値) が生じる。現在、日本病理学会から提案されているゲノム診療用病理組織検体取扱い規程でも、リアルタイム PCR を用いた  $\Delta Ct$  値が品質指標として挙げられている。

幅広く使われている PCR では、検体からの核酸抽出を含めて品質管理を効果的に実施することで、より確実な精度管理が可能となる。

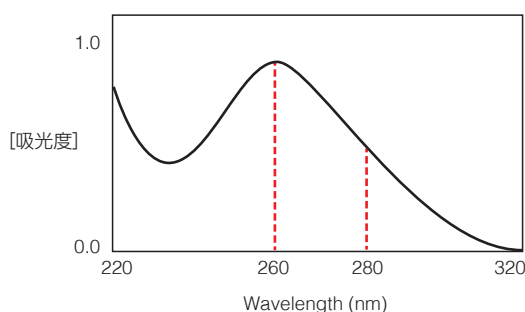


図1 核酸の特徴的な吸光度波形の一例

260nm にピークがあり、260 と 280nm の比が約 2.0 となる。

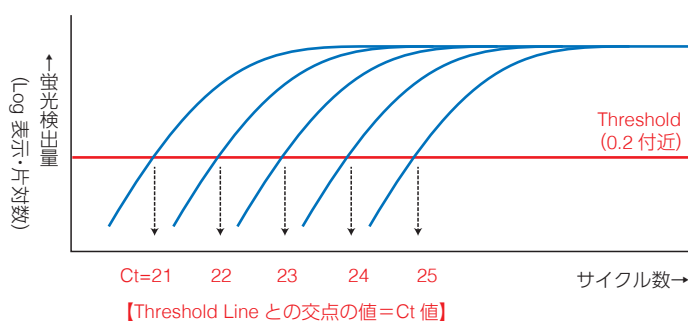


図2 PCR サイクル数に依存した蛍光増幅曲線のサイクル

Ct 値の比較により 1 サイクル 2 倍の量比で定量する。



## 講演2

# 生化学検査の精度管理 基礎からトラブルシュートまで

演者

浦和医師会メディカルセンター

神山 清志 先生

## 精度保証および精度管理図の基本

近年、医療法が改正され臨床検査技師がやっていくべき仕事  
が明文化されたことは喜ばしいことであり、現在の医療におい  
て臨床検査は不可欠のものとなっていることから、臨床検査  
技師はその立場を主張して、社会にさらに認知されるように努  
力する必要がある。精密で正確なデータを迅速に出して、コス  
ト管理をしながら周りから信頼を得ていく上では、ISO15189  
などの第三者認証も重要となる。

精度管理の観点で臨床検査に必要な事項として、まず精度管  
理図を用いた品質保証は必要不可欠なものである。それに加え  
て、基準値(基準範囲)を客観的に求めずにデータの判断はでき  
ず、またその根底には検査値の生理変動への考慮が必要となる。  
そして精密さ、正確さ、不確かさに基づいて許容限界を決定す  
る。このようなプロセスを体系立てて進めていることを第三者  
が認証し、検査室は継続して運用する。さらに危機管理、臨床  
支援、チーム医療など、様々な角度からアプローチして、社会  
に認められ、臨床に貢献し、患者のためになる仕事ができるよ  
うにするのが精度管理だと考えている。精度保証は狭い意味で  
は精度管理図を作成することであるが、広い意味では様々なこ  
とを記録に残して、共有して、伝達して、周りに発信していく  
ことで成り立つ。

精度管理図を書くためには、まず数値が必要となる。一般的  
な定量検査は、標準品の吸光度と検体の吸光度を比較して間接  
推定することから比較分析とも呼ばれる。HPLC や電気泳動  
法、超遠心法などの物理的に目的物を抽出する分離分析も最終

的に抽出物の濃度を決めるのは標準品と比較した比較分析にな  
る。血球や有形成分の算定検査も数値として結果が出るため精  
度管理図を作成することができる。細胞診や病理検査について  
は、精度管理図は作成できないが、客観的な技術評価の体系化  
やクロスチェックなどの結果を書類として残しておくことで代  
用することができる。その他の微生物検査、輸血検査、生理検査、  
あるいは採血に関しても、精度管理図は作成できないが、マニ  
ュアルや標準作業書などの記録を残しておくことが大事である。

生化学検査において、登録衛生検査所の指導要綱では、100  
件に対して1回管理試料を測定することになっているが、理  
想的にはLow、Medium、Highといった3種類の濃度の管理  
試料を測定し、さらに可能であれば水も載せることを推奨した  
い(図1)。水は通常であれば絶対にゼロを打つことから、何ら  
かの異常を検出できることがある。例えばデータにばらつきが  
ある中で水がゼロを打つ場合にはサンプル系の異常がある可能  
性があり、水の数値が出ている場合には光学系あるいは試薬分  
注系の異常の可能性が考えられる。

## 精度管理データを解釈する際の注意点

一般的なX bar-R管理図は、各測定値の平均値をX bar、  
高い値と低い値の差の絶対値をRange(R)としてプロットし  
ていく。ところがX bar-R管理図は、X bar(平均値)にしない  
と完了しないため、リアルタイムの精度管理として、あるい  
は朝一番の精度管理として役に立たない。またシフト・トレ  
ンドに関しては、例えば2SD以内に入っているでも3点以上連  
続したトレンドが検出されたとして、気づいたときには3日

管理試料は低濃度(L)、中濃度(M)、  
高濃度(H)の3種類は測定したい。また、  
免疫項目やリポ蛋白の管理は専用の管理試  
料を用いることが望ましい。  
また、可能なら水も載せるべきである。  
データ異常でサンプリング系の障害の場合  
は管理試料の測定値はばらつくが水は0と  
なる。



図1 精度管理試料の測定

経過してしまう。したがって  $\bar{X}$ -R 管理図は万能ではなく、 $\bar{X}$ - $R_s'$ ・ $\bar{X}$ - $R_s$ -R 管理図のほうが向いていると言える。

$\bar{X}$  管理図は測定毎に、その結果をそのままプロットする。それにより、すでにプロットされている前日の  $\bar{X}$  と比較ができることから、 $\bar{X}$  にしなくても、 $\bar{X}$  との比較で高いか低いかが分かる。 $R_s'$  は 1 回目と 2 回目の差の絶対値で、4 回測定していれば 3 つの  $R_s'$  が出る。 $\bar{X}$  は従来通りの平均値で、 $R_s$  は  $\bar{X}$  の差の絶対値を示すため 2 日目からプロットされる。 $R$  は従来通りの高い値と低い値の差の絶対値である。これらを用いて、管理図上でそのまま目視でプロットしておけば、少なくとも朝一番の 1 回目、2 回目など、その日の  $\bar{X}$  が出る前のある程度の判断材料になる (図 2)。

外部精度管理調査 (EQA) は各種団体から提供されているもので、誤解されやすいのは原則的に精密さの調査である点であり、集団の平均値からどの程度ずれているかの確認である\*。外部精度管理の実施にあたっては、理想的には日常検査法に対して精密さの評価ができていて、維持確認もできていて、標準品に相当するものを 5 重測定して、正確さも確認している状況で外部精度管理に参加したほうがよい。患者からすれば、検査値の精密さよりも正確さを望んでいるからだ。

外部精度管理の 1 つの問題点として、平均値は真値か、絶対かという問題がある。無作為抽出したデータは、母集団のデータを反映することは言うまでもないが、外部精度管理調査では作爲的抽出であることが少なくない。また、外部精度管理用の試料はヒト試料と反応性が異なるため、変動が生じる可能性がある。外部精度管理調査では測定方法別に集計されるが、全体の平均値は当然多数を占める測定方法による結果に引っ張られるため、実際には少数のグループが実施している測定法で一次標品、二次標品を測りながら検量している代表的な値であったとしても、集団の原理からすると C 評価、D 評価になってしまう可能性がある。

現在の精度管理には種々の落とし穴がある。1 つは精度管理試料の非特異的反應で、汎用管理血清で HDL コレステロール、LDL コレステロールを測定してもリポ蛋白として入っていない

ため、ほとんど意味はない。また、動物ベースの血清での CRP や免疫項目の測定については、人間の抗原に対する抗体のためヒトと同じデータは出ないことに加え、高濃度試料の場合は AST 高値、CK 高値の試料を作るために動物の肝臓をすり潰したものが入っていたとしたら、必ずしもヒトの試薬と同じ反応はしない。

管理図の解釈に関しても、通常の  $\bar{X}$ -R 管理図は系統誤差しか検出できないため、 $R$  が大きければばらついている可能性があるものの、検体個々の評価はできない。また、検体が十分量採取できていない場合でも精度管理のデータは出るということも知っておく必要がある。偶発誤差の発見率は、管理試料の測定のタイミングに偶発誤差がぶつからない限りないので、系統誤差はそのほとんどがキャリブレーションのときに偶発誤差が運悪くやってきたものである可能性を考えた方がよい。以上のようなことから、一件一件の測定値について精密さを論じるのであれば、すべての検査を二重に行う必要がある。ただ、現在の自動分析装置も試薬も性能が向上していることから、最初と最後に管理試料を測ってみれば、その間は問題ないのではないかという推定の上で成り立っていると言える。

許容限界については、過去に AST に関して実施した調査では、概ね 10% 程度はばらつきがあることが分かった。430 人の臨床医を対象に行ったアンケート調査でも、臨床医が望む AST の許容限界は 10% 程度であり、日本臨床化学会が示している許容限界も同様である。また、個人の生理変動についても、過去に健常人で 10 週にわたり週 1 回測定した AST のデータにおいて少なからず生理変動があることを確認した。個人の体の中でも相応のばらつきがあることから、あまり狭い許容限界を求めても仕方がなく、生理変動の 2 分の 1 くらいを精密さの許容限界にするというのはとても理にかなった話ではある。

\*質疑応答の際に、座長の宮地先生から「実態は別として、一般的に外部精度管理調査は施設間の検査データの共有という観点において、真値にどれだけ近い正確さか、施設の固有誤差を評価することを目的としている」と補足説明がありました。

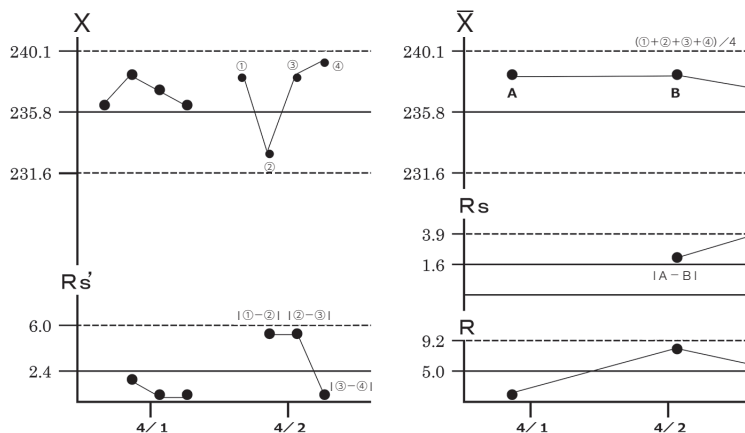


図 2  $\bar{X}$ - $R_s'$ ・ $\bar{X}$ - $R_s$ -R 管理図の説明



### 講演3

## 遺伝子関連検査の精度管理の実際

演者

北海道大学病院検査・輸血部

藤澤 真一 先生

### LDTにおける精度管理の実際

遺伝子関連検査は大きく病原体核酸検査、体細胞遺伝子検査、生殖細胞系列遺伝子検査の3つに分けられる。このどれもが病気の診断、治療方針の決定、治療効果の判定という臨床判断に大きく寄与する検査であると言える。体外診断薬や機器が整備されている項目もあるが、まだ自家調整検査法(LDT)が多い分野でもある。

ISO15189で求められる内部精度管理については、結果が意図したとおりの品質を達成しているか検証することを目的としている。精度管理物質としては、患者サンプルとできるだけ近いものとされ、臨床判断値付近のもの、第三者の管理物質の使用を考慮することが推奨されている。実施頻度については明確な規定はなく、その測定系の持っている手順の安定性や、誤った結果から患者が受ける有害リスクによって施設ごとに決定することになっている。

精度管理データの評価のポイントとしては、あらかじめ設定した精度管理ルールに違反し、なおかつその結果に臨床的に重大なエラーが含まれていることが疑われた場合は、その結果は棄却してエラーを修正し、規定された性能仕様内であることを検証した後で再検査することを要求している。また、そのような場合には、最後に成功した結果までさかのぼって調査すること、シフト・トレンドを検出するために一定期間内にレビューすることが要求されている。

当施設では、ウイルス核酸定量検査、造血器腫瘍に関するキメラ mRNA 定性検査、mRNA 定量検査、変異解析、マイク

ロサテライト解析、HIV ジェノタイプングを実施している。保険承認試薬を使用しているのはウイルス核酸定量のみで、その他は LDT である。内部精度管理としては、ウイルス核酸はプール血漿、定性検査や変異解析は陽性コントロールと陰性コントロール、リアルタイム PCR や HIV ジェノタイプングなどは、その分析プロセスで得られる Ct 値や検量線のスロープ値などのパラメーターを精度管理指標として利用している。

ウイルス核酸定量検査の内部精度管理については、検体の遠心分離、自動分析装置による分析、結果報告と大まかに3つの工程があり、それぞれの工程に専用試薬、専用機器がある。遠心分離工程における検体の目視性状確認も、広い意味では精度管理の一つに位置付けている。この測定系自体を監視するものとして、当初はキット添付コントロールを使用していたが、ロットをまたいでの評価ができないこともあり、現在ではプール血漿を用いて PCR の反応の総和を見ることで、よりシフトやばらつきを検出できるようになった(図1)。当施設ではまだ導入していないが、サードパーティ・コントロールの使用も考慮する一定の意義があると考えられる。

LDT の WT1 のリアルタイム PCR 検査の精度管理については、まず細胞のライセートを作った状態での性状確認、溶血不良がないか、粘性が強くないか、といった確認・調製も精度管理の一つと位置付けている。そして RNA を抽出したところで吸光度計を使って、量、濃度、比を見て、品質を確認している。その後、キャリブレータ用に使用している K562 というセルラインから得られた RNA を一緒に測定して、キャリブ

レータでもありコントロールでもあるという位置付けとしている。最後のダブルチェックも精度管理の一つに含まれる。精度管理指標は、K562 細胞の WT1 の Ct 値、GAPDH の Ct 値、GAPDH と WT1 の比としており、Mean と 2SD、3SD、過去のデータから計算した管理幅でモニターしている。内部精度管理の結果のまとめとして、管理幅の定義やシフト・トレンドの有無、管理幅から外れたデータに対する考察などのコメントを付記するようにしている(図2)。

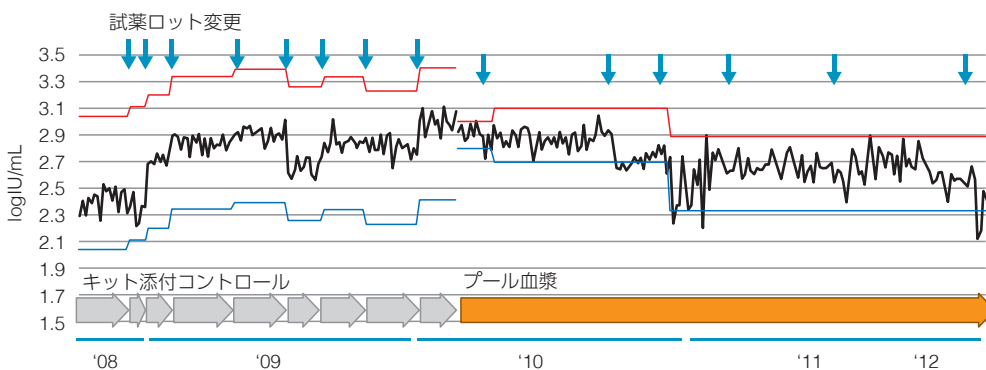


図1 HCV RNA 定量の内部精度管理

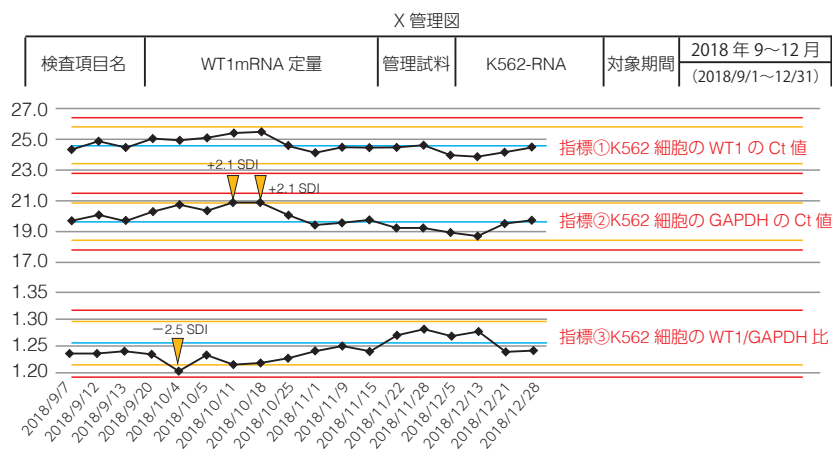


図2 WT1 mRNA(ΔΔ Ct法)の内部精度管理

【検査室の評価】精度管理基準は2016/3/30～2016/12/22の47回のアッセイに使用した現行ロットの管理試料兼キャリブレーション (lot:140731-1) にて算出した数値であるが、以降のロット変更時にシフトも見られていないことから継続使用している。期間中シフト、トレンドは見られず引き続き良好に推移していた。10/4にWT1/GAPDHが-2.5SDI、10/11および10/18のGAPDHで+2.1SDIと、2SDI超過が見られた。9/20～10/18の期間はWT1、GAPDHともに高めで推移していたことが原因であり、根本原因として、この期間使用していたDNAポリメラーゼの活性低下が最も疑わしいと推察した。精度管理上は警告レベルだが、患者時系列および臨床症状に照らし、特別問題はなかったことから、再検査までは不要と判断した。

## 外部精度管理における代替アプローチの実践

外部精度管理について、ISO15189では適切な検査結果および解釈を目的として実施するとされている。基本方針としては、外部精度管理プログラムがある場合はそれに参加し、ない場合は自ら開発すること、患者サンプルと同様に取り扱うこと、検査手順から検査後手順まで全部のプロセスをチェックする機能があることが望ましいとされている一方で、実施の頻度については特に記載がない。測定の方法については、可能な限り日常のワークフローに組み込んで、普段検査を実施している要員が普段と同様に実施することとされている。禁止事項としては、データの提出日まで他の参加者と連絡を取ってはならない、データ提出前に結果の確定目的で委託してはならない、といったことも記載されている。当施設での基本方針としては、基本的にあるものには参加するというスタンスで、HBおよびHCのウイルス核酸定量のサーベイに参加しており、HIVの耐性遺伝子検査は研究班の主催のサーベイに参加している。それ以外のものは公的なサーベイがないため、基本的には自らそれに代わるものを開発して実施している。

評価のポイントとしては、関連スタッフ間でレビューすることがキーワードとして記載されている。是正処置の実行には実際に検査を行っているスタッフが参加し、是正処置を講じた場合はその有効性を監視する。一方で問題がなかった場合でも、何か潜在的不適合がないか傾向を評価して、何か見出されたら予防処置を講じる。つまり外部精度管理の結果だけで終わってはいけないということである。

外部精度管理の代替アプローチに関しては、ISO15189では「いかなるときも」という比較的厳しい表現になっており、例

外なく実施して客観的な証拠を提供できる状態にしておくことが求められている。実施にあたっては、認証標準物質、過去に検査したサンプル、保存細胞または組織からの材料、他の検査室とのサンプルの交換、サーベイで用いられる管理物質など具体的な例も示されている。当施設では、年1回リアルタイムPCRを用いる検査の外部精度管理の代替アプローチとして、過去に測定したサンプルを採用し、濃度や量の異なる複数の試料を用意してブラインドで測定するようにしている。最初に報告した値を目標値として、許容範囲はその検査の再現性、臨床判断値を目安に設定した。合否基準としては、この目標値に近い値であれば合格として、不合格だった場合には再度測定するかサンプルを変更して測定した結果が合格であればそれでよしとしている。再測定で外れた場合には原因究明および是正処置を講じるとした。過去に測定したサンプルを測ることが外部精度管理といえるのかどうかという点については、一定期間経過したということは、その間に試薬のロットや機械の状態も変わっていて、実施するスタッフの力量が違えば、それは別の検査室で測定したデータと比較したものとみなせるだろうと解釈している。

初検値を目標値とし、WT1では目標値の2分の1～2倍の間、それ以外では10分の1～10倍の間を許容範囲に設定した代替アプローチを用いた結果を見てみると、1項目を除いて再現性が得られたことが分かった。許容範囲を超えてしまったものに関しても、別のサンプルで再測定すると許容範囲内の結果であった。現状ではやや広めの許容範囲であるが、今後のデータの蓄積によって狭めていける可能性がある。今までは代替アプローチに関する要求事項もなければ、このような実験をしたこともなかったため、長期的再現性を知る上で良い経験になった。

Find out more at [thermofisher.com/MASproductivity](https://thermofisher.com/MASproductivity)

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
 The views in these presentations were those of the Speaker(s) and do not necessarily present the views of Thermo Fisher Scientific.  
 Printed in Japan. 2008-mpr-022-1  
 CDD-FR-MTL-0155

## サーモフィッシャーダイアグノスティクス株式会社

〒108-0023 東京都港区芝浦4-2-8 住友不動産三田ツインビル東館

☎ 0120-489-211 受付時間 9:00～17:30 (土日祝日・年末年始を除く)

✉ JPYOK-CDD.QC@thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC