

[治 験 論 文]

鼻咽頭ぬぐい液を対象とした新型コロナウイルス遺伝子検出 POCT 試薬
「スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬」の検討

守屋 任¹⁾・山元 佳²⁾・秋山 徹³⁾・木下典子²⁾・須藤 務²⁾・本橋亜耶乃¹⁾
宇佐見彩香¹⁾・猪坂英里奈¹⁾・安藤ほなみ¹⁾・大木 仁¹⁾・黒川正美¹⁾・目崎和久¹⁾
田中暁人¹⁾・荘司 路¹⁾・小関 満¹⁾・木村 基⁴⁾・大曲貴夫²⁾

¹⁾ 国立研究開発法人国立国際医療研究センター病院中央検査部門

²⁾ 国立研究開発法人国立国際医療研究センター病院国際感染症センター

³⁾ 国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所

⁴⁾ 国立研究開発法人国立国際医療研究センター臨床研究センター

(令和2年9月26日受付, 令和2年11月11日受理)

COVID-19は、SARS-CoV-2による感染症であり、2020年世界的パンデミックを起こし、日本においても国を挙げた対応が余儀なくされている。COVID-19診断には主として臨床材料から病原体遺伝子を検出する方法が用いられる。2020年8月に新しい検査法として、株式会社ミズホメディーから全自動遺伝子検出装置 Smart Gene用の新型コロナウイルス検出試薬が販売された。この遺伝子検出法は、鼻咽頭を拭ったスワブを専用の抽出液に懸濁した後、専用のテストカートリッジに4滴滴下するだけのワンステップで検査が可能な Point of care testing 遺伝子検出法である。本検討は、凍結保存していた鼻咽頭拭いウイルス輸送培地 25検体を対象に、この新しい検査法と TaqMan プローブを用いた定量リアルタイム one-step RT-PCR 測定結果を比較評価することを目的として行った。検討の結果、陽性一致率 100% (10/10)、陰性一致率 100% (15/15)、全体一致率 100% (25/25) であり、本検討のうち最も低 RNA コピー数の検体は 6.41 copies/test だった。この新しい遺伝子検出法は、簡便な操作性からクリニックや中核病院まで幅広い診療現場で利用可能であり、フレキシブルな PCR 検査対応により診療及び感染管理に役立つことが期待される。

Key words: SARS-CoV-2, 新型コロナウイルス遺伝子検査, Smart Gene, スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬テストカートリッジ

序 文

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、コロナウイルス科ベータコロナウイルス属の SARS-CoV-2 の感染症であり、2019年12月より中華人民共和国湖北省武漢市を中心に発生し、世界的パンデミックを引き起こしている急性呼吸器症候群である¹⁾。本邦においてもパンデミックを引き起こし、指定感染症²⁾として定められたことや、新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言³⁾など国を挙げた対策が取られてきた。COVID-19の特徴として、発症前感染者や無症候感染者によっても伝播⁴⁾することが挙げられ、ユニバーサルマスク等の病院内外を問わない感染予防が不可欠な状況となっている。

COVID-19診断においては、重症化マーカーや画像診断など臨床診断の一部として活用できるデータが明確になってき

ている⁵⁾一方で、病原体の検出、病原体遺伝子の検出または病原体抗原を検出することにより確定診断となる⁵⁾⁶⁾。RT-PCR検査による遺伝子検出方法は、検出感度の問題から単独の検査としては完全な診断法とはいえないものの、抗原検査と比較すると感度が高い⁷⁾ため、現状ではCOVID-19病原体検出のゴールドスタンダードに位置付けられる。一方で、COVID-19診断に用いられるRT-PCR法の抱える問題点として、検査時間が長いこと、検査に習熟した人材が必要であることが挙げられる⁸⁾。これに対し、2020年8月に新しい新型コロナウイルス遺伝子検出 POCT 試薬である「スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬テストカートリッジ」が株式会社ミズホメディーから販売開始となった。本検査法は、全自動遺伝子解析装置 Smart Gene (株式会社ミズホメディー) を使用する Q プローブ法を原理とした遺伝子検出方法⁹⁾であり、鼻咽頭拭い液を専用のスマートジーン新型コロナウイルス検出試薬抽出液セット (株式会社ミズホメディー、以下、SG抽出液) に溶解した後、テストカートリッジに滴下するだけのワンステップ検体操作で SARS-CoV-2 の核酸抽出、核酸増幅検出を約 60 分で検査することができる^{9)~11)}。今回我々は、当院で COVID-19 と診断された患者の鼻咽頭拭い凍結保存臨床検体を検討対象として、この新しい新型コロナウイルス遺伝子検出 POCT 試薬「スマートジーン

著者連絡先：(〒162-8655) 東京都新宿区戸山 1-21-1

国立研究開発法人国立国際医療研究センター病院中央検査部門

守屋 任

TEL: 03-3202-7181

FAX: 03-3207-1038

E-mail: amoriya@hosp.ncgm.go.jp

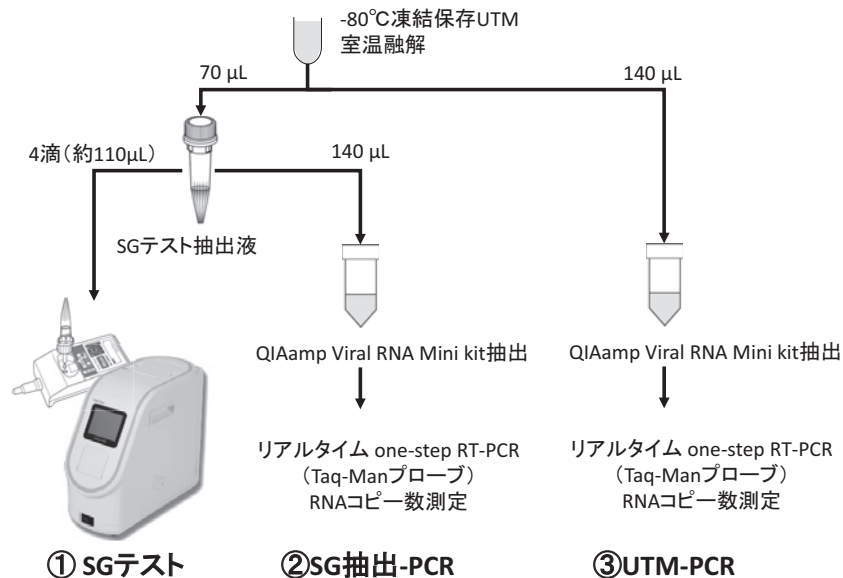


図1. 検討の概要：凍結保存 UTM から測定，比較検討

ン新型コロナウイルス検出試薬テストカートリッジ」を用いた SARS-CoV-2 検出性能を評価するため，TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法¹²⁾ (以下，感染研法 PCR) 定量測定を対照に比較を行った。

材料と方法

1. 検討対象

2020年3月6日から2020年6月8日までに国立国際医療研究センター病院で診断された COVID-19 患者の鼻咽頭をフロックスワブ (COPAN 社) で拭い，汎用輸送培地 UTM (COPAN 社，以下 UTM) に懸濁し， -80°C で凍結保存していた 25 検体を対象として検討を行った。検討対象 25 検体のうち，10 検体は採取時の RT-PCR 検査結果，検体採取時期から RT-PCR 陽性が見込まれる検体を対象とし，15 検体は陰性見込みの検体を対象とした。本研究で検討に用いた臨床材料は，国立国際医療研究センター病院の新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の前向き観察研究 (NCGM-G-003472-027) で保管検体の二次利用について同意を得た症例を対象とし，倫理委員会の承認 (NCGM-G-003472-027) を得て実施した。

2. 検討方法

本検討概要は図 1 に示す流れで，凍結保存 UTM を測定検体として室温で融解し混和した後，下記の①～③の測定を行った。

①スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬テストカートリッジによる測定 (以下，SG テスト)

添付文書¹⁰⁾上の測定方法では，UTM 等の液相培地へ接種せずスポンジスワブで採取した鼻咽頭ぬぐい液を直接，専用の SG 抽出液に浸し，検査を実施するものである。そのため本検討では，スポンジスワブの採取量と同程度の UTM 70 μL をスワブ採取検体と見立てて，SG テスト添付文書，Smart Gene 測定機器手順に従い測定，結果判定を行った^{9)~11)}。

②SG 抽出液の残液を検査材料とした感染研法 PCR 測定 (以下，SG 抽出-PCR)

上記①で測定した抽出液の残液 140 μL をサンプルとして，国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9¹²⁾に従い，QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA 抽出を実施した。SARS-CoV-2 核酸増幅検出には，Step OnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用して N セット，N2 セットそれぞれ二重測定を行い threshold cycle 値 (以下，Ct 値) の平均値を求めた。RNA 定量値を求めるためサンプル測定と同時に，既知濃度 RNA 試料である新型コロナウイルス陽性コントロール RNA 2 種/1 セット (株式会社日本遺伝子研究所) から希釈系列 (5, 50, 500, 5000 copies/ μL) を作成し，N セット，N2 セットそれぞれ二重測定を行い，その平均値から検量線を作成した。この検量線とサンプル測定で得られた Ct 値から RNA コピー数を算出した。

③UTM を検査材料とした感染研法 PCR 測定 (以下，UTM-PCR)

室温で融解，混和した後の UTM 140 μL をサンプルとして QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA 抽出を実施し，上記②と同様の方法でサンプルの Ct 値を求めた。RNA 定量についても上記②と同様の方法で測定し RNA コピー数を算出した。

上記，①SG テストと②SG 抽出-PCR で得られた結果を比較し，陽性一致率，陰性一致率を求めた。併せて，①SG テスト陽性判定サイクル数と②SG 抽出-PCR の RNA コピー数から，回帰直線を作成し，SG テスト陽性サイクル数と RNA コピー数の相関を求めた。相関を求める際には，SG テストで用いる検体量 110 μL に合わせて SG 抽出-PCR の RNA コピー数を換算し相関グラフを作成した。両者の相関性について，Spearman の順位相関係数による検定を行った。

②SG 抽出-PCR 結果と③UTM-PCR 結果を比較し，相関係数と回帰直線の分析により SG 抽出-PCR 測定で算出され

	① Smart Gene test		Total
	Positive	Negative	
② RT-PCR with Smart Gene extraction fluid	Positive	10	10
	Negative	0	15
Total	10	15	25

図2. スマートジーンテスト結果とスマートジーン抽出液から実施した感染研法 PCR 結果比較

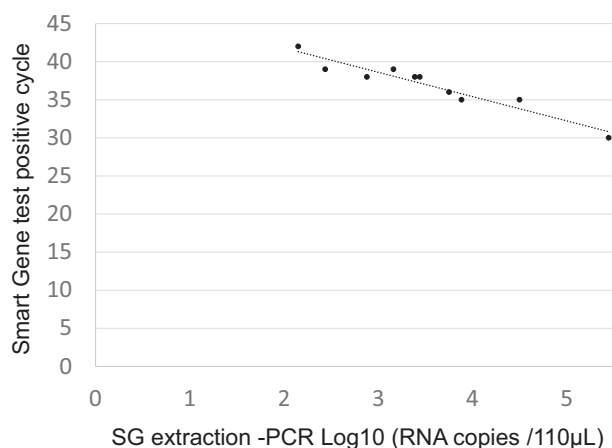


図3. SG テスト陽性サイクル数と SG 抽出液-PCR RNA 定量 (Log10 copies) の相関グラフ
 回帰直線 $y = -3.1901x + 48.172$, $r^2 = 0.9152$, $r = -0.9567$

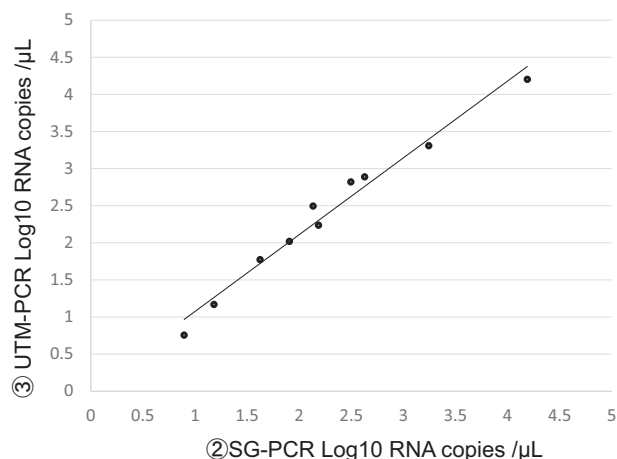


図4. SG 抽出-PCR RNA 定量 (Log10 copies) と UTM-PCR RNA 定量 (Log10 copies) の相関グラフ
 回帰直線 $y = 1.0351x + 0.0403$, $r^2 = 0.97594$, $r = 0.9879$

た RNA コピー数定量測定が妥当であるか検証した。回帰直線の計算には②と③が同一測定法であるため、②と③ともに自然対数に換算しグラフを作成した。妥当性の判断基準は、相関係数 $r=0.7\sim 1.0$ 、回帰直線傾き $0.9\sim 1.1$ で確認した。②と③の相関性について Spearman の順位相関係数による統計的な検定を行った。

結 果

1. SG 抽出-PCR を対照とした SG テストの比較結果

①SG テスト結果と②SG 抽出-PCR 結果は図2.に示すとおり、陽性一致率 100% (10/10)、陰性一致率 100% (15/15)、全体一致率 100% (25/25) となった。①SG テスト陽性サイクル数と、②SG 抽出-PCR による RNA 定量の相関は、図3.に示すとおりである。本検討中のうち最も低い濃度を示した検体では、①SG テスト 42/45 サイクル陽性が②SG 抽出-PCR で 6.41copies/テストを示した。Spearman の順位相関係数 $r_s = -0.9236$ ($p < 0.0001$) で、統計的に有意な相関を認めた。

2. SG 抽出-PCR と UTM-PCR の比較による RNA 定量測定の妥当性確認

②と③それぞれの RNA コピー数/テスト (5 µL) から、抽出液、核酸抽出操作による希釈倍率を UTM 1 µL あたりのコピー数に換算した log10 (RNA コピー数) の相関を図4.に示す。妥当性の判断基準である相関係数 $r=0.7\sim 1.0$ 、回帰直線傾き $0.9\sim 1.1$ を満たし、Spearman の順位相関係数 $r_s = 0.9879$ ($p < 0.0001$) で統計的に有意な相関を認めた。

考 察

検討結果から、SG テストは検討対象とした臨床材料の測定において、感染研法 PCR と比較して陽性一致率 100%、陰性一致率 100%、全体一致率 100% の良好な結果が得られた。本検討で対照法として実施した SG 抽出-PCR による RNA 定量については、UTM-PCR との相関性が判断基準を満たし、本測定方法が妥当であると判断した。SG テスト陽性サイクル数と SG 抽出-PCR による RNA コピー数の相関より、計算上では 45/45 サイクルは、4.3 copies/110 µL に相当する。一方で、本検討で実測値として求められた 6.41 copies/テストは、SG 抽出液 140 µL をスピカラムにより 60 µL 濃縮した核酸抽出液 5 µL 測定であることから、 $6.41 / (5 \times 140 / 60) \times 110 = 60.44$ copies/110 µL となる。本実測値よりも低 RNA コピー数の臨床材料に対する SG テストの検出感度については、計算上の推定値であるため今後のさらなる検討が必要と考える。本検討方法では、凍結保存 UTM を検査材料として検討を行ったが、本来 SG テストは採取した鼻咽頭拭いスワブを直接 SG 抽出液に懸濁することで高い検出感度を示すため、実際の診療現場では UTM などの液相培地を介さず SG 抽出液に懸濁することが望ましい。SG 抽出液に直接スワブ懸濁を行うことによるメリットには、感度のほかに、SG 抽出液に含まれるグアニジン塩が一般的にウイルスを速やかに不活化し、RNA を安定した状態で保つ¹³⁾といわれており、SARS-CoV-2 においても同様の報告がされている¹⁴⁾。病原体の取り扱い上、SARS-CoV-2 感染疑いの臨床材料から遺伝子検出を実施するには BSL2 に対応する環境、クラス IIA 以上の安全キャビネット等を用意する必要がある¹⁵⁾。一方で、SG

テストは抽出液をベッドサイドや検体採取現場に予め準備し、十分な感染対策を講じて検体採取し、その場で抽出液に懸濁、適切な処置の上で搬送を行うことで、BSL2環境を介さずに遺伝子検出を行うことが可能と考える。また、Smart Gene操作自体も極めて簡便であるため、Smart Geneを診療現場に設置することで、遺伝子検査を専門とする検査技師を介さずにSARS-CoV-2遺伝子検査結果を出すことが可能となる。RT-PCR法による病原体遺伝子検出は、他の検査法と比べて高い感度と特異度である一方で、短所として検査時間が長く、専用の機器および熟練した検査技師が必要⁵⁾であることが挙げられている。遺伝子検査に熟練した検査技師の不在や、BSL2対応環境の整備は、SARS-CoV-2 RT-PCRの病院検査導入に高いハードルになっていると考えられ、これも一因となり、これまでに他の遺伝子検査を実施してこなかった医療施設によるSARS-CoV-2 RT-PCRの新規導入を難しくしていると推察される。これに対し、SGテストは極めて簡便な手技によりベッドサイドで遺伝子検出を迅速に行うことができるため、幅広い多くの医療機関でSARS-CoV-2遺伝子検出が実施可能となるため、臨床現場でのCOVID-19診断および感染管理の迅速化が期待される。本検討は、鼻咽頭拭い液のUTM凍結保存陽性検体の限られた検体を対象としたものであるため、十分な偽陽性、偽陰性の評価や、低濃度RNAウイルスコピー数の臨床材料についても十分な検討ができていない。また、測定原理上、影響が考えられる鼻咽頭以外の唾液、喀痰等の粘性の高い検体の影響を評価できていないため、今後のさらなる検証によりこれらの問題を明確にすることが必要と考える。

謝辞：本検討は、国立研究開発法人 国立国際医療研究センター病院 国際感染症センターの臨床研究「新型コロナウイルス遺伝子検出POCT試薬の臨床評価に関する研究」で実施した。検体採取および採取同意の取得にご協力を賜りました国立国際医療研究センター国際感染症センターの診療医、本研究にあたりご協力を賜りました国立国際医療研究センター研究所 島田佳世先生、櫻井優先生、ならびに株式会社ミズホメディー 今村正様、長野隆志様、大和久正人様、橋原謙次様、石橋直人様に深謝いたします。

利益相反：本研究は共同研究契約書を締結し、共著者である山元に対する株式会社ミズホメディーからの研究費提供により実施した。

文 献

- 1) Qun, Li, Gua Xuhua, Wu Peng, et al. 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med.* 382 (13): 1199-1207.
- 2) 厚生労働省. 2020. 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施行について (施行通知). 健発0128第5号. 2020年2月18日.
- 3) 新型コロナウイルス感染症対策推進室. 新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言の実施状況に関する報告. 内閣官房. https://corona.go.jp/news/news_20200421_70.html 2020年6月4日現在.
- 4) Zhiru, Gao, Xu Yinghui, Sun Chao, et al. 2020. A Systematic Review of Asymptomatic Infections with COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020 May 15.
- 5) 新型コロナウイルス感染症対策推進本部 診療の手引き検討委員会. 2020. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 診療の手引き 第3版. 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/content/000670444.pdf> 2020年9月4日現在.
- 6) 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について. 第7指定感染症. 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-shitei-01.html> 2020年5月13日現在.
- 7) 新型コロナウイルスに関するアドホック委員会. 2020. 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 (第1版). <https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200827-1.pdf> 2020年8月27日現在.
- 8) 長野隆志. 2019. 新しいPOCT遺伝子検査システム Smart Gene. *Precision medicine* 2 (10): 43-47.
- 9) 株式会社ミズホメディー. 全自動遺伝子解析装置 Smart Gene 添付文書. 2018年10月作成 (第一版). <https://www.mizuho-m.co.jp/product/uploads/attach/smartgene.pdf>.
- 10) 株式会社ミズホメディー. スマートジーン 新型コロナウイルス検出試薬テストカートリッジ. 2020年8月作成 (第一版). <https://www.mizuho-m.co.jp/product/files/570825-01.pdf>.
- 11) 株式会社ミズホメディー. スマートジーン 新型コロナウイルス検出試薬抽出液セット. 2020年8月作成 (第一版). <https://www.mizuho-m.co.jp/product/files/570826-01.pdf>.
- 12) 国立感染症研究所. 2020. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9. 令和2年3月18日.
- 13) Michael, R. G, J Sambrook, P MacCallum. 2014. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.
- 14) Ying, Yan, Chang Le, Wang Lunan. 2020. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol.* 30 (3): e2106. 2020 May.
- 15) 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. 2020. 日常検査体制の基本的考え方の提言 (2020年4月13日 (第1版)).

Validation of a new SARS-CoV-2 gene detection POCT reagent “Smart Gene COVID-19 detection kit” with nasopharyngeal swab

Ataru Moriya¹⁾, Kei Yamamoto²⁾, Toru Akiyama³⁾, Noriko Kinoshita²⁾, Tsutomu Sudo²⁾, Ayano Motohashi¹⁾, Ayaka Usami¹⁾, Erina Isaka¹⁾, Honami Ando¹⁾, Hitoshi Ohki¹⁾, Masami Kurokawa¹⁾, Kazuhisa Mezaki¹⁾, Akihito Tanaka¹⁾, Michi Shoji¹⁾, Mitsuru Ozeki¹⁾, Moto Kimura⁴⁾, Norio Ohmagari²⁾

¹⁾Laboratory Testing Department, Center Hospital of the National Center for Global Health and Medicine

²⁾Disease Control and Prevention Center, Center Hospital of the National Center for Global Health and Medicine

³⁾Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

⁴⁾Center for Clinical Sciences, National Center for Global Health and Medicine

COVID-19 is determined by detection of SARS-CoV-2 gene with reverse-transcription PCR (RT-PCR) in routine clinical practice. A new POCT RT-PCR test for detection of SARS-CoV-2 called Smart Gene kit (SG test) was launched by MIZUHO MEDY Co., Ltd in Japan in August 2020. The SG test is a method that enables gene detection with a simple one-step operation, and is a gene detection method based on the quenching probe method. The aim of this study was to verify basic analytical of SG test, used 25 samples of nasopharyngeal swabs cryopreserved with virus transport medium. The comparison method was measured by quantitative one-step RT-PCR (RT-qPCR). The comparison results were 100% sensitivity (10/10), 100% specificity (15/15), and 100% overall concordance (25/25). In this study, the minimum detection concentration of the SG test was 6.41 copies/5 μ L. From this result, it was judged that the SG test has sufficient performance as a SARS-CoV-2 genetic test method. Because the SG test can be operated simple one step and easily, it will be possible to perform the genetic test of COVID-19 in a wide range of medical sites such as clinics and core hospitals. There is a shortage of PCR tests in Japan, but the SG test could be a key point to overcome this.