

[短 報]

GeneXpert システムおよび SmartGene における塩酸グアニジン添加輸送液を用いた  
鼻咽頭ぬぐい液からの SARS-CoV-2 RNA 検出の検討

川本柚香<sup>1)</sup>・坂梨大輔<sup>1)</sup>・高山美奈<sup>1)</sup>・宮崎成美<sup>1)</sup>・大野智子<sup>1)</sup>  
山田敦子<sup>1)</sup>・中村明子<sup>1)</sup>・太田浩敏<sup>1)</sup>・末松寛之<sup>1)</sup>・千田澄江<sup>2)</sup>  
平井 潤<sup>1)2)</sup>・山岸由佳<sup>2)3)</sup>・三嶋廣繁<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup> 愛知医科大学病院感染制御部感染検査室

<sup>2)</sup> 愛知医科大学病院感染症科

<sup>3)</sup> 高知大学医学部臨床感染症学講座

(令和4年12月23日受付, 令和5年3月16日受理)

我々は、GeneXpert (GX) および SmartGene (SG) による新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 核酸検出における不活化剤 (塩酸グアニジン) 含有輸送液 (GBM) の適応を検証した。患者から採取された Universal transport medium (UTM) または GBM に浸漬された鼻咽頭ぬぐい液を cobas 8800 で測定後、各輸送液の陽性 30、陰性 15 検体を GX と SG で再測定した。対 cobas 8800 の陽性/陰性一致率 (%) は GX-UTM で 93/100、GX-GBM で 100/100、SG-UTM で 80/100 および SG-GBM で 80/100 であった。同一機器における UTM と GBM の群間比較では、cobas 8800 との Ct 値の差が GBM で UTM より有意 ( $p < 0.01$ ) に低く、GBM は GX、SG に利用可能と考えられた。GBM 適応拡大は検査の安全性向上に寄与すると考える。

**Key words:** 不活化剤含有輸送液, 迅速核酸増幅装置, GeneXpert, SmartGene

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 感染症; coronavirus disease 2019 (COVID-19) が世界的問題となっている<sup>1)</sup>。感染拡大防止および COVID-19 早期診断には迅速かつ正確な SARS-CoV-2 検出が重要であり、Reverse transcription real-time PCR (rRT-PCR) は信頼性の高い検査法として汎用されている<sup>2)</sup>。検査前プロセスにおいては、採取検体中のウイルス RNA を減らさないことおよび検査従事者の曝露感染を防ぐことが求められるが、これらのニーズに対しウイルス不活化剤・RNA 安定剤を含む輸送液 (以下、不活化剤含有輸送液) が上市された。各試薬の添付文書では、不活化剤含有輸送液は主に大規模施設などで利用されるハイスループット PCR 装置で使用可能だが、核酸抽出を行わないタイプの試薬では PCR に阻害的な影響を及ぼす可能性が指摘されている<sup>3,4)</sup>。さらに、多くの中小規模施設で利用されている迅速核酸増幅装置では不活化剤含有輸送液の影響について添付文書に記載がない。そのため、ハイスループット PCR 装置と迅速核酸増幅装置を運用している施設では輸送液の使い分けが生じている。不活化剤含有輸送液に迅速核酸増幅装置への適応があれば輸送液の統一化が可能となり、より安全・効率的に検査を実施できる。そこで、今回我々は不活化剤含有輸送液が迅速核酸増幅装置で使用可

能か検討した。

対象は、2021 年 6 月から同年 10 月の期間に当院の発熱外来受診者から採取されコパン Universal Transport Medium (UTM) 3.0 mL (コパンジャパン) にて提出された鼻咽頭ぬぐい液 (UTM 群)、および愛知医科大学メディカルセンター発熱外来受診者から採取され不活化剤 (塩酸グアニジン) 含有輸送液; コバス PCR メディア 4.3 mL (ロシュ・ダイアグノスティックス) にて提出された鼻咽頭ぬぐい液 (Guanidinium-based medium; GBM 群) について、cobas 8800 システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) (cobas 8800) で SARS-CoV-2 RNA を測定した。UTM 群および GBM 群それぞれ cobas 8800 において SARS-CoV-2 の threshold cycle value (Ct 値) が 20 未満、20 以上~25 未満、25 以上~30 未満、30 以上~35 未満、35 以上を示した陽性検体各 6 検体 (計 30 検体ずつ) および陰性検体 15 検体ずつ、両群計 90 検体を対象とし SmartGene (ミズホメディー) および GeneXpert システム (ベックマン・コールター) (GeneXpert) で当日中 (24 時間以内) に再測定した (Figure 1)。測定までは指針に従い 4℃ で保存した<sup>2)</sup>。なお本研究は当院倫理委員会の承認 (承認番号 2022-574) を得て行った。

cobas 8800 の試薬は cobas SARS-CoV-2 & Flu A/B (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた。UTM 群はコバス omni セカンダリーチューブ (ロシュ・ダイアグノスティックス) に移し替え、GBM 群は開栓後そのまま機械に投入した。その他の手順は添付文書に従い実施し、得られた結果の中でより低い Ct 値を代表値とした。

GeneXpert は Xpert Xpress SARS-CoV-2 「セフィエド」 (ベックマン・コールター) の添付文書に従って実施した。結

著者連絡先: (〒480-1195) 愛知県長久手市岩作雁又1番地1  
愛知医科大学病院感染制御部感染検査室  
川本柚香  
TEL: 0561-62-3311(内線 35823)  
E-mail: kawamoto.yuzuka.055@mail.aichi-med-u.ac.jp

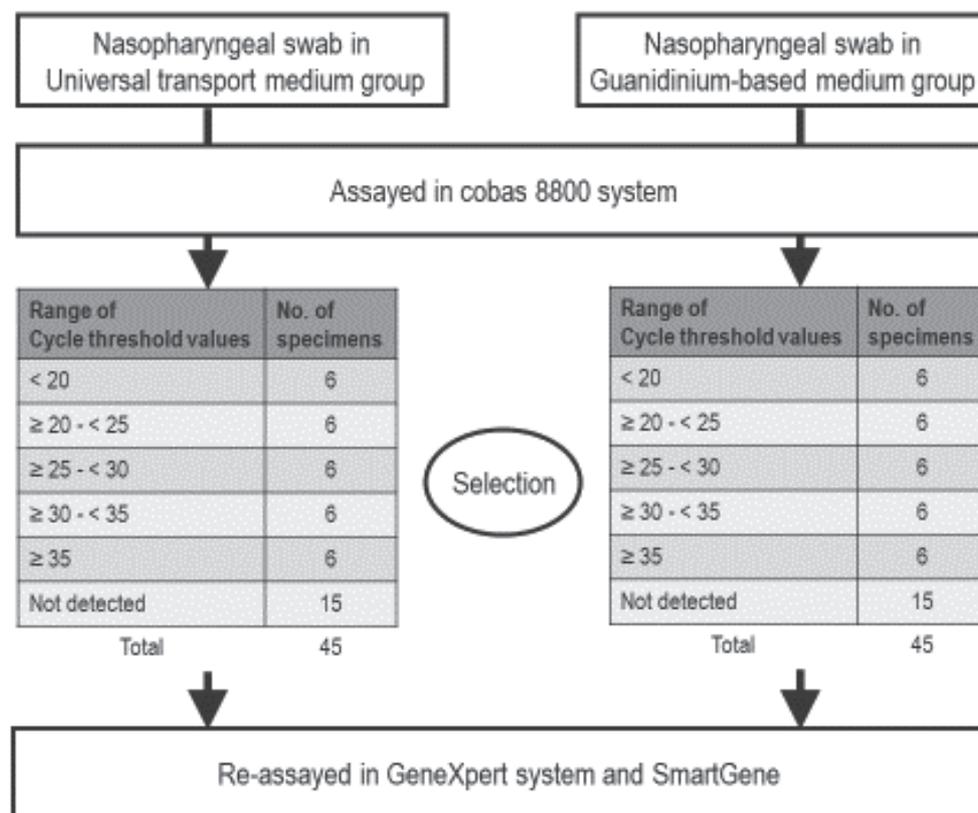


Figure 1. Assay scheme in this study.

Table 1. The positive concordance rate in each ranges of cycle threshold values by cobas 8800.

Range of cycle threshold values by cobas 8800 system	no.	No. (%) of positive result			
		GeneXpert		SmartGene	
		UTM	GBM	UTM	GBM
<20	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
$\geq 20$ -<25	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
$\geq 25$ -<30	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
$\geq 30$ -<35	6	6 (100)	6 (100)	5 (83)	4 (67)
$\geq 35$	6	4 (67)	6 (100)	1 (17)	1 (17)
Overall	30	28 (93)	30 (100)	24 (80)	23 (77)
Not detected	15	0	0	0	0

Abbreviations: UTM: Universal transport medium, GBM: Guanidinium-based medium.

果判定は機器表示に従い、より低い Ct 値を代表値とした。

SmartGene は、メーカーが提示する UTM を用いた測定法に基づき、各検体 300  $\mu$ L をスマートジーン SARS-CoV-2 検体採取セット（ミズホメディー）の抽出液に添加した。以後、添付文書に従って測定し、結果判定は機器の表示に従った。

UTM 群と GBM 群それぞれについて cobas 8800 をリファレンスとし、GeneXpert および SmartGene の結果の陽性一致率、陰性一致率、および全体一致率を算出した。陽性一致率については各測定法と cobas 8800 の Ct 値の差（各測定法の Ct 値-cobas 8800 システムの Ct 値）について、同一検

体における機器間差の検討および同一機器における UTM 群と GBM 群間の比較を行った。同一検体による Ct 値の機器間差については Wilcoxon の符号順位検定を、同一機器における UTM 群と GBM 群間の比較については Mann-Whitney U 検定をそれぞれ行い、ともに有意水準は  $p < 0.01$  とした。有意差検定は統計分析ソフトウェア「R」パッケージ exactRankTests に搭載されている関数 wilcox.exact にて算出した。

結果一致率について Table 1 に示す。全検体ともすべての機種で増幅阻害は発生しなかった。cobas 8800 に対する GeneXpert の陽性一致率、陰性一致率および全体一致率は UTM

Table 2. The threshold cycle values of the discordant results.

medium (no.)	Threshold cycle values of				
	cobas 8800		GeneXpert		SmartGene
	E	ORF1ab	E	N2	
Universal Transport Medium (6)	33.65	34.49	33.9	35.5	ND
	35.26	36.26	32.8	36.0	ND
	36.07	ND	ND	ND	ND
	36.33	37.72	38.6	36.6	ND
	36.61	37.48	ND	ND	ND
	37.22	ND	ND	41.1	ND
Guanidinium-based medium (7)	33.55	34.34	32.9	34.5	ND
	34.51	35.20	31.7	33.1	ND
	35.73	ND	35.3	37.8	ND
	35.85	ND	33.3	34.7	ND
	36.06	ND	38.9	41.9	ND
	36.44	ND	ND	38.8	ND
	37.00	ND	39.5	39.1	ND

Abbreviations: ND: not detected.

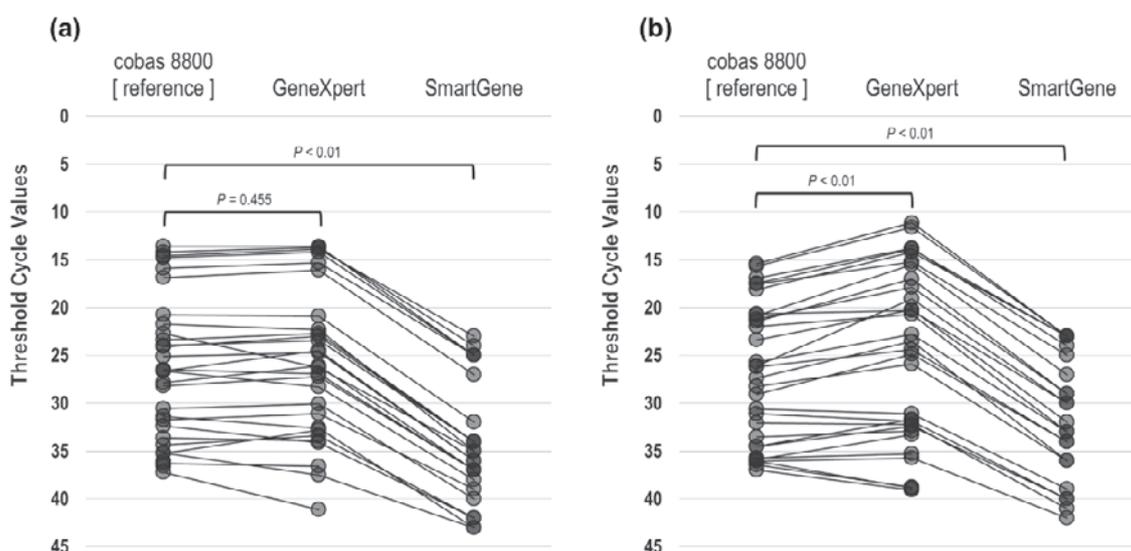


Figure 2. Comparison of threshold cycle values of positive concordant specimens between cobas 8800 and GeneXpert analysis or SmartGene. (a) Universal transport medium group. (b) Guanidinium-based medium.

群で 93% (28/30), 100% (15/15) および 96% (43/45), GBM 群ではすべて 100% であった。cobas 8800 に対する SmartGene の陽性一致率, 陰性一致率および全体一致率は UTM 群で 80% (24/30), 100% (15/15) および 87% (39/45), GBM 群で 77% (23/30), 100% (15/15) および 84% (38/45) であった。結果不一致例を Table 2 に示す。陽性不一致例はいずれも cobas 8800 の Ct 値が高値の検体であった。

陽性一致検体における各測定法と cobas 8800 との Ct 値の差について, 同一検体における機器間差を Figure 2 に, 同一機器における UTM 群と GBM 群間の比較を Figure 3 に示す。同一検体における GeneXpert と cobas 8800 の Ct 値比較では, UTM 群では有意差は認められなかったが, GBM 群では GeneXpert の Ct 値が有意に低かった。同一検体における SmartGene と cobas 8800 の Ct 値比較では, UTM・

GBM 両群とも SmartGene の Ct 値が有意に高かった。同一機器における cobas 8800 と UTM 群と GBM 群間の Ct 値比較 (各測定法の Ct 値-cobas 8800 システムの Ct 値) では, GeneXpert・SmartGene ともに GBM 群の Ct 値が有意に低かった。

今回, われわれは 2 つの迅速核酸増幅装置について cobas 8800 と比較し不活化剤含有輸送液が利用可能か評価した。本研究では, 全検体・全測定法で増幅阻害は認められず, 不活化剤含有輸送液が迅速核酸増幅装置の rRT-PCR に対し阻害的に作用する可能性は低いと考えられた。cobas 8800 との陽性不一致例は GeneXpert の UTM 群で 2 例, SmartGene の UTM 群で 6 例と GBM 群で 7 例あった。添付文書記載の SARS-CoV-2 最小検出感度 (limit of detection : LOD) (copy/mL) は cobas 8800, GeneXpert および SmartGene

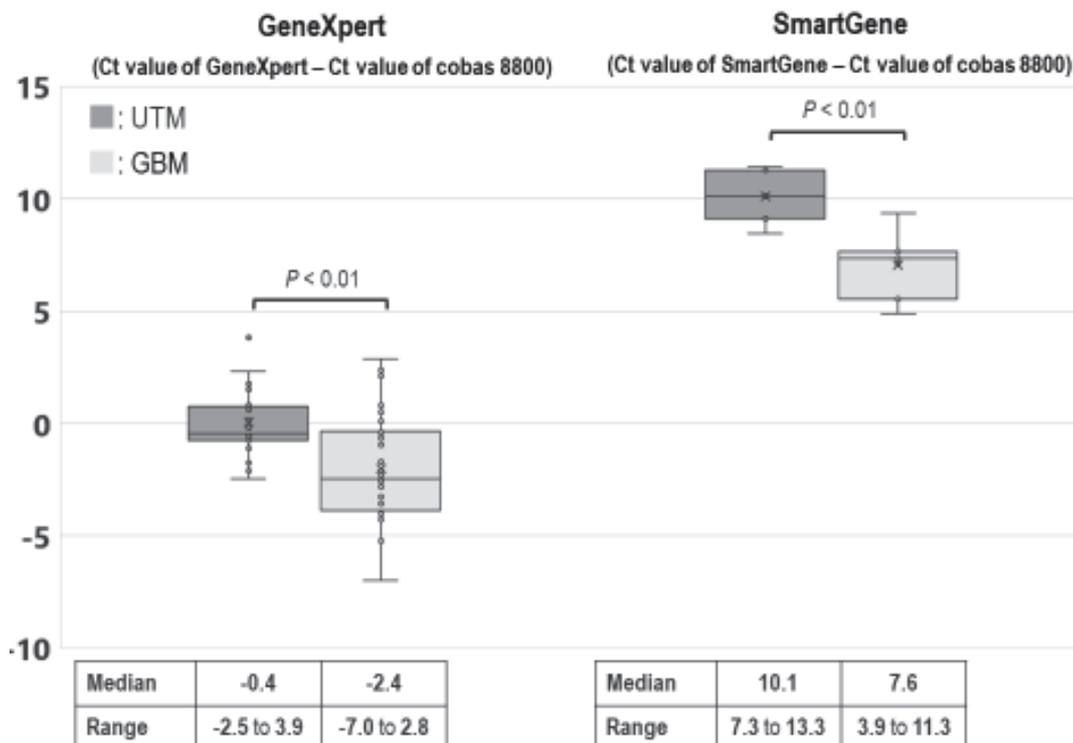


Figure 3. Comparison of the difference of threshold cycle values with cobas 8800 between Universal transport medium (UTM) group and Guanidinium-based medium (GBM).

それぞれ 47, 250 および 1100 である。結果不一致検体は含有ウイルス量が cobas 8800 の LOD 以上かつ各測定法の LOD 未満であったため結果が乖離したものと考えられた。

GeneXpert と cobas 8800 の陽性一致検体における Ct 値の差については、低ウイルス量の鼻咽頭ぬぐい液検体を用いた検討において両機器の間に有意差を認めず、高い相関が示されたとの報告がある<sup>5)</sup>。本研究の UTM 群においても両法の Ct 値に有意差は認められず、先行文献を支持する結果となった。一方、GBM 群ではむしろ GeneXpert の Ct 値が cobas 8800 より有意に低かった。Manohar らは cobas 6800/8800 において GBM は UTM に比べ Ct 値が高めに算出されたと報告している<sup>6)</sup>。従って、GeneXpert は cobas と比較して GBM と UTM の違いによる影響を受けにくい可能性が示唆された。

SmartGene は、これまでに UTM を用いた方法が検討されており、国立感染症研究所の RT-PCR 法と高い一致率を示したことが報告されている<sup>7)8)</sup>。本研究では UTM に加え GBM も検討した。SmartGene と cobas 8800 の陽性一致検体における Ct 値の差については、UTM・GBM 両群とも SmartGene の Ct 値が有意に高かったが、その差は UTM 群より GBM 群で有意に小さかった。以上より、SmartGene の専用採取キットにはグアニジンが含まれており、SmartGene 測定自体がグアニジン含有で最適化されていることから、Ct 値 (SmartGene-cobas) の差がより小さくなったものと考えられ、GBM は UTM 同様に SmartGene で使用できることが示唆された。ただし、SmartGene は発症から時間が経過した患者検体等で偽陰性となる可能性が指摘されて

おり<sup>9)10)</sup>、本研究においても偽陰性が認められている。UTM・GBM 検体での SmartGene の実施は発症直後の患者検体、他機器で低い Ct 値が示された検体の再検などへの活用が可能と考えられた。

以上の結果から、GBM は GeneXpert、SmartGene においても UTM と同様に使用可能であり、測定器間の輸送液統一化が可能であると考えられた。不活化剤含有輸送液の適応拡大は、SARS-CoV-2 検出の安全な検査フロー構築に寄与するものとする。しかし、塩酸グアニジンには毒性があるため試薬管理に注意する必要がある。

**利益相反：**本研究に関する利益相反はない。

## 文 献

- 1) World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> 2022年3月14日現在。
- 2) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針. 2022. 第5版. 2022年3月1日.
- 3) ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社. コバス SARS-CoV-2&Flu A/B. 2022年2月作成 (第1版).
- 4) 坂口剛正, 長岡里枝, 榎山誠也, 他. 2021. コバス PCR メディアの使用による SARS-CoV-2 不活化の検討. 医学と薬学 78 (3): 275-280.
- 5) Broder, K, A. Babiker, C. Myers, et al. 2020. Test Agreement between Roche Cobas 6800 and Cepheid GeneXpert

- Xpress SARS-CoV-2 Assays at High Cycle Threshold Ranges. *J. Clin. Microbiol.* 8 (8): e01187-20: 1-3.
- 6) Chitra, M, J. Sun, P. Schlag, et al. 2022. Agile design and development of a high throughput cobas SARS-CoV-2 RT-PCR diagnostic test. *Heliyon* 8 (9): e10591.
- 7) 守屋 任, 山元 佳, 秋山 徹, 他. 2021. 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. *日臨徴誌* 31 (2): 47-51.
- 8) 国立感染症研究所. 2022. 病原体検出マニュアル. 2019-nCoV. Ver.2.9.1. 令和2年3月19日.
- 9) 若松謙太郎, 香月耕多, 池田哲治, 他. 2021. スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬の臨床性能評価. *日呼吸誌* 10 (3): 229-235.
- 10) 若松謙太郎, 香月耕多, 池田哲治, 他. 2021. スマートジーンを用いた SARS-CoV-2 核酸検出検査における陽性判定サイクル数 (Ct 値) についての検討. *医学と薬学* 78 (5): 643-651.

## Evaluation of guanidinium-based medium for GeneXpert and SmartGene to detection of SARS-CoV-2 RNA

Yuzuka Kawamoto<sup>1)</sup>, Daisuke Sakanashi<sup>1)</sup>, Mina Takayama<sup>1)</sup>, Narimi Miyazaki<sup>1)</sup>, Tomoko Ohno<sup>1)</sup>, Atsuko Yamada<sup>1)</sup>, Akiko Nakamura<sup>1)</sup>, Hirotohi Ohta<sup>1)</sup>, Hiroyuki Suematsu<sup>1)</sup>, Sumie Chida<sup>2)</sup>, Jun Hirai<sup>1) 2)</sup>, Yuka Yamagishi<sup>2) 3)</sup>, Hiroshige Mikamo<sup>1) 2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Infection Control and Prevention, Aichi Medical University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Infectious Diseases, Aichi Medical University Hospital

<sup>3)</sup>Department of Clinical Infectious Diseases, Kochi Medical School University

The COVID-19 is diagnosed by reverse-transcription PCR in clinical laboratories. A medium containing guanidium thiocyanate is able to inactivate SARS-CoV-2 at the time of specimen collection, and it may reduce the risk of infection. In this study, we aimed to verify the suitability of guanidinium-based medium (GBM) for GeneXpert and SmartGene to detect SARS-CoV-2 RNA. The clinical specimens of nasopharyngeal swabs were collected from patients using a universal transport medium (UTM) or a GBM. The specimens were diagnosed by the reference method; cobas 8800. Thirty positive and fifteen negative specimens were selected from both group of UTM and GBM, and re-assayed in GeneXpert and SmartGene. As the result, no PCR inhibition result was observed for any specimen. The positive/negative agreement rates (%) of the combination settings using reference were as follows: GeneXpert-UTM 93/100; GeneXpert-GBM 100/100; SmartGene-UTM 80/100; and SmartGene-GBM 77/100. For the difference of the threshold cycle values with reference method, GBM-group was significantly lower ( $p < 0.01$ ) than UTM-group, in both GeneXpert and SmartGene. In summary, our result suggested that the GBM can be an alternative tool to perform GeneXpert and SmartGene for the detection of SARS-CoV-2 RNA. We believe that GBM would provide a safety work-flow in the clinical laboratory.