



● 2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady[®] SARS-CoV-2 i の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ

庄司麻土香
宇根 蔵人
東田 悟
塚本 悠

1. はじめに

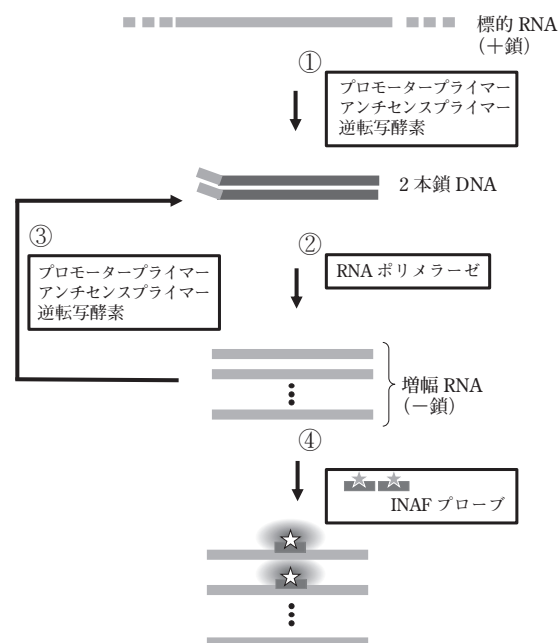
新型コロナウイルス (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) は 2019 年 12 月に中国の武漢でのアウトブレイクをきっかけに全世界に広まり、感染者は未だに増加し続けている。全世界における現在までの感染者は 2.19 億人、死者は 455 万人に達し、日本においても第 5 波が到来した (2021 年 9 月 9 日現在)。SARS-CoV-2 は人に感染すると、発熱、呼吸器症状等を引き起こす。重症化した場合、肺炎を発症し、呼吸器不全を引き起こすケースがある。感染を拡大させない観点からも、迅速かつ確実な検出は、必要不可欠である。日本でも感染者の増加に伴い、遺伝子検査が実施されるようになったが、当初は多くの施設で国立感染症研究所発行の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 (以下、感染研マニュアル)」に準じた方法が採用されていた¹⁾。感染研マニュアルに記載の方法は、手動操作が多く、遺伝子検査に慣れていない医療施設では人手や技術的な部分で実施が困難であった。また迅速性に欠けるといった課題点も発生した。そのため、迅速/簡便という特徴をもつ TRCReady を用いた専用試薬の製品化が多くの医療機関から望まれていた。

そこで、迅速、簡便な遺伝子検査法として TRC 法を用いた 2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady[®] SARS-CoV-2 i を開発したので報告する。「すべての人に健康と福祉を」を目標に、本製品は、医療のひっ迫という社会課題に対して、医療負担の軽減に貢献することを目指している。

2. TRC 法の原理と特徴

TRC 法は 46℃ の一定温度で RNA を増幅する TRC (Transcription - Reverse transcription - Concerted)

反応と増幅 RNA に特異的に結合する事により蛍光を発する INAF (Intercalation Activating Fluorescence) プローブを組み合わせた方法であり、標的 RNA の増幅と検出を 1 本のチューブ内にて 20 分で実施できる²⁾ (図 1)。さらに、専用装置である自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80、TRCR[®] 核酸精製キットと組み合わせることにより、40 分で核酸精製から検出まで全自動で実施可能である (図 2)。



- ①プロモーター配列を付加したプライマー、アンチセンスプライマーと逆転写酵素により標的 RNA から 2 本鎖 DNA が合成される
- ②RNA ポリメラーゼにより標的 RNA の相補鎖 (一鎖) が増幅合成される
- ③増幅された RNA の一部からプロモーター配列を付加したプライマー、アンチセンスプライマーと逆転写酵素により 2 本鎖 DNA が合成される
- ④INAF プローブは増幅合成された RNA と特異的に結合し、蛍光強度が増加する

図 1 TRCReady[®] SARS-CoV-2 i における TRC 反応原理図

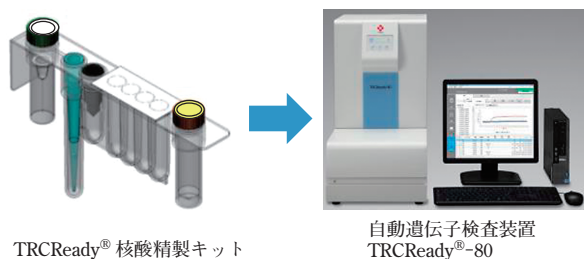


図2 TRCReady システム概要

3. 新型コロナウイルス RNA 検出試薬の開発

ウイルスは変異が起りやすいため、試薬開発においては変異発生率の低い領域を選択することが課題であった。また、他のウイルスを検出しないために、特異性を高くすることも課題であった。この2つの課題を解決するため、新型コロナウイルスの検出ターゲットとして Nucleocapsid タンパク質をコードする遺伝子（以下、N 遺伝子）領域を選択した。N 遺伝子領域を検出ターゲットにすることにより、新型コロナウイルスの安定的な検出や高い特異性が期待できた。

4. 試薬性能の向上に向けた取り組み

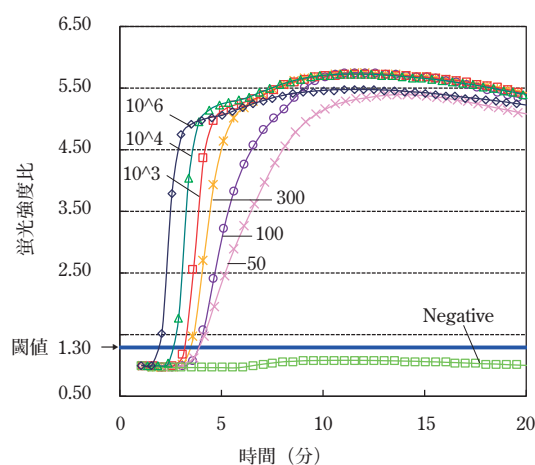
新型コロナウイルスの遺伝子検査には、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液が用いられる³⁾。鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液と比較し、唾液には様々な夾雑物が多く含まれるため、検出感度が著しく低下する課題があった。我々は検出感度の低下要因の一つとして、宿主由来の核酸がプライマー、プローブと非特異的な結合を形成し、TRC 反応を阻害している可能性を考え、この非特異的な結合を最小とするプライマー、プローブを設計、検討することで、阻害感受性の低い配列を見出すことができた。この配列を用いることにより、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液と同程度の感度で唾液検体を測定可能となった。

5. 基本性能評価

新型コロナウイルス N 遺伝子領域 RNA 溶液を開発した本キットにて測定した結果を図3に示す。なお、図3において横軸は反応開始からの時間を示し、縦軸は蛍光強度比（蛍光強度/初期蛍光強度）を示している。蛍光強度比が1.30以上となった時間を検出時間とした場合、本キットは50～10⁶コピー/テストの

N 遺伝子領域 RNA を5分以内に検出した。本キットの最小検出感度試験の結果を表1に示す。低い濃度の30コピー/テストのN 遺伝子領域 RNA まで検出することができ、十分な感度であることが確認できた。

本キットの特異性試験の結果を表2に示す。なお、判定は反応開始後20分以内に蛍光強度比が1.30以上になった時に陽性、1.30未満の時を陰性とした。結果、本キットは新型コロナウイルス以外の菌およびウイルスについて、10⁷ Colony Forming Unit または RNA 10⁵ コピーを測定したところ、全て陰性となり、十分な特異性をもつことが確認できた。



新型コロナウイルス N 遺伝子領域 RNA を1テストあたり50～10⁶コピーとしたときの、各蛍光強度比。横線は閾値1.30を示す

図3 各コピー数における蛍光強度比

表1 最小検出感度

コピー/テスト	陽性数/テスト数
300	6/6
100	6/6
50	6/6
30	6/6
10	3/6

6. 模擬検体を用いた評価

【評価方法】

国立医薬品食品衛生研究所から公表された「模擬ウイルスを用いた核酸増幅検査薬の一斉試験」の評価にならない、模擬ウイルス「AccuPlex SARS-CoV-2 (full genome)」(SeraCare 社) を170コピー/mL から43,000コピー/mL となるようにPBSを用いて希釈したものをサンプルとし、検体持ち込みからRNA抽出、

表2 特異性試験

菌種	判定
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	陰性
<i>Acinetobacter baumannii</i>	陰性
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	陰性
<i>Alcaligenes faecalis</i>	陰性
<i>Legionella pneumophila subsp. Pneumophila</i>	陰性
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	陰性
<i>Empedobacter brevis</i>	陰性
<i>Escherichia coli</i>	陰性
<i>Flavobacterium odoratum(Myroides odoratus)</i>	陰性
<i>Haemophilus influenzae</i>	陰性
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	陰性
<i>Mycoplasma pneumoniae(M129)</i>	陰性
<i>Bordetella pertussis</i>	陰性
<i>Moraxella catarrhalis</i>	陰性
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	陰性
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	陰性
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	陰性
<i>Serratia marcescens</i>	陰性
<i>Staphylococcus aureus</i>	陰性
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	陰性
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	陰性
<i>Streptococcus pyogenes</i>	陰性
<i>Legionella longbeachae</i>	陰性
Adenovirus(71 starain)	陰性
Parainfluenza virus 1	陰性
Enterovirus 68	陰性
Respiratory syncytial virus subtype A	陰性
Respiratory syncytial virus subtype B	陰性
Rhinovirus	陰性
Human Coronavirus OC43	陰性
Human Coronavirus 229E	陰性
SARS Coronavirus (2003)	陰性
MERS Coronavirus	陰性
Influenza A H1N1	陰性
Influenza A H3N2	陰性
Influenza B	陰性

試薬/反応系までを含めた検査系全体を評価した⁴⁾。

[評価結果]

本キットを用いた評価例を表3に示す。国立感染症研究所が提示する検査法を用いた場合に50コピー/反応に相当する4,300コピー/mLの検体を100% (6/6)「陽性」と判定した。

7. 模擬検体を用いた評価

[評価方法]

国立感染症研究所から公開された「新型コロナウイルス(2019-nCoV)の遺伝子検査法の性能評価について」に基づき、新型コロナウイルスRNAコピー数を、10コピーから200,000コピーの範囲内で均等に分布さ

表3 模擬ウイルスを用いた評価例

コピー/mL (検体持ち込み量 200 μ L)	陽性数/テスト数
43,000	6 / 6
17,000	6 / 6
4,300	6 / 6
1,700	6 / 6
430	5 / 6
170	1 / 6
0	0 / 6

せた陽性検体10例、および陰性検体15例を測定した⁵⁾。検体は、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液の前処理済試料にウイルス模擬物を規定量添加したものをを用いた。あわせて、感染研マニュアルに記載の標準法であるリアルタイムone-step RT-PCR法(以下、PCR法)との比較検討を実施した。

[評価結果]

本キットとPCR法の相関性試験結果を表4に示す。鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液いずれの検体においても、全体一致率は100%、陽性一致率が100%、陰性一致率が100%と90%以上の良好な相関が得られた。本キットは、PCR法と同等の性能を有しているものと推察される。また、本キットの検出時間とPCR法のCt値の関係を図4に示す。本キットの検出時間とPCR法のCt値に一定の相関があることを確認できた。

表4 相関性試験

鼻咽頭拭い液		PCR法	
		陽性	陰性
本キット	陽性	10	0
	陰性	0	15
		陽性一致率: 100% (10/10)	
		陰性一致率: 100% (15/15)	
		全体一致率: 100% (25/25)	
鼻腔拭い液		PCR法	
		陽性	陰性
本キット	陽性	10	0
	陰性	0	15
		陽性一致率: 100% (10/10)	
		陰性一致率: 100% (15/15)	
		全体一致率: 100% (25/25)	
唾液		PCR法	
		陽性	陰性
本キット	陽性	10	0
	陰性	0	15
		陽性一致率: 100% (10/10)	
		陰性一致率: 100% (15/15)	
		全体一致率: 100% (25/25)	

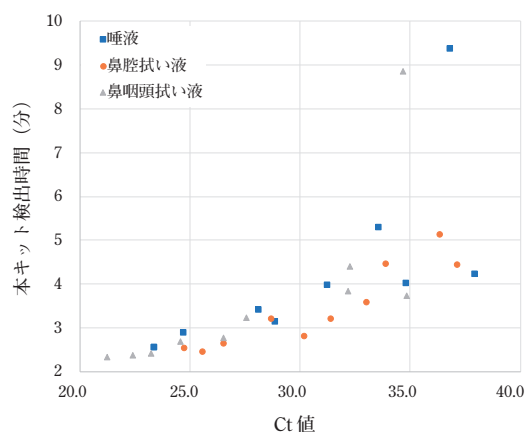


図4 本キットの検出時間と Ct 値の相関図

8. まとめ

PCR 法に比べ、新型コロナウイルスを迅速、簡便に測定可能な試薬を開発した (表 5)。また、模擬検体を用いた評価でも PCR 法と同等の感度、特異度を有していた。本キットは、高い評価を得て多くの施設で導入され、医療のひっ迫という社会課題に対して医療負担の軽減に貢献している。

表 5 感染研マニュアルとの比較

	感染研マニュアル	本キット
検出法	PCR 法	TRC 法
検査時間※1	約 210 分	40 分
核酸抽出工程	用手法	自動
核酸増幅工程	用手法	自動

※1：核酸抽出から測定完了までの時間

参考文献

- 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
[online] <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>
- 2) T. Ishiguro et al., Anal. Biochem., 314 (1), 77-86
- 3) 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 第 4 版
- 4) 国立医薬品食品衛生研究所、COVID-19 診断用核酸増幅検査約一斉試験の結果報告 (公開版)
[online] <https://www.mhlw.go.jp/000746161-1.pdf>
- 5) 国立感染症研究所、新型コロナウイルス (2019-nCoV) の遺伝子検査法の性能評価について
[online] <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/>