COVID-19 診断における
「Ampdirect™ Technology 2019 新型コロナウイルス検出試薬キット」の有用性

[1)]埼玉医科大学病院 中央検査部　[2)]同 感染症科・感染制御科

折原　悠太[1)]　川村利江子[1)]　小棚　雅寛[1)]
酒井　　純[2)]　今井　一男[2)]　樽本　憲人[2)]
武内　信一[1)]　前﨑　繁文[2)]　前田　卓哉[1)]

序　　文

COVID-19 の診断は、患者検体から RNA を抽出したのち、RT-qPCR 法でウイルスゲノムを検出することが基本である。今後の感染拡大に備えるためには PCR 検査体制の拡充が必要であり、ウイルス RNA 抽出をいかに簡略化させ、検査時間を短縮化できるかが鍵となる。島津製作所より発売された「Ampdirect™ Technology 2019 新型コロナウイルス検出試薬キット」(以下本キット)では、RNA 抽出がワンステップの短時間処理で完結でき、1 本のチューブで検体の処理から RT-qPCR 反応まで可能である。本研究では、凍結保存していた鼻咽頭拭い液用い、本キットの有用性を評価したので報告する。

材料・方法

本検討は埼玉医科大学病院 IRB の承認を得て実施した（承認番号：19136 号)。

1）対象検体

2020 年 3 月から 4 月にかけて、SARS CoV-2 RT-PCR の院内検査を目的とし、COVID-19 の疑い患者より採取した鼻咽頭スワブ 52 検体の懸濁液残余を使用した。各スワブは 200 µL の PBS で懸濁したのち、本研究に使用するまでその残余を-80℃で厳重に凍結保存した。

2）従来法による RT-qPCR 検査

RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社)を使用し、最終的に Buffer AVE 60 µL にて RNA を抽出した。RT-qPCR (TaqMan 法)は国立感染症研究所のガイドラインを参考に、QuantiTect Probe RT-PCR Kits を用いて N2 領域の検出を試みた[1)]。

3）本キットによる解析

保存していた残余懸濁液 5 µL をキットに添付される Sample Treatment Reagent 5 µL を混合し、サーマルサークラーを用いて 90℃, 5 分間の加熱処理を実施した。その後、添付文書に従い QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific 社)により SARS CoV-2 を検出した。RT-PCR は以下の温度条件で実施し、内部コントロール (Internal Control; IC) (Cy5)の立ち上がりを確認するとともに、N1 領域 (ROX), N2 領域 (FAM)の増幅曲線の上昇を目視で確認し、その時の Cycle 数を記録した (42℃, 10 min + 95℃, 1min +[95℃, 5sec+60℃, 30 sec] x 45 cycles)。なお、本キットでは、N1 もしくは N2 領域のいずれかで増幅曲線に上昇がみられた場合に、SARS CoV-2 を陽性と判定した。

結　　果

本研究で使用した 52 検体について、従来法である RT-qPCR による検出結果ならびにその時の Ct 値を Table に示した。52 検体のうち陽性 30 検体、陰性 22 検体であった。次に、本キットによる検出結果ならびに最終的な判定結果をあわせて Table に示した。従来法による RT-qPCR での陽性 30 検体のうち、IC については 4 検体 (No 3, 6, 7, 19) で増幅を認めなかった。一方、N1 および N2 領域に対しては、それぞれ 3 検体で増幅を認めることができなかった。最終的に 30 検体中 29 検体で SARS CoV-2 陽性と判定し、本キットによる SARS CoV-2 の検出感度を 96.7% (29/30)と算出した。

なお、従来法による RT-qPCR 陰性 22 検体の解析では、N1 ならびに N2 領域のいずれにも増幅がみられず、すべての IC で増幅を認めたため、本キットでもすべて陰性と判定できた。

Table. RT-qPCR 陽性検体での本キットの判定結果

検体番号 (Ct)	Shimazu (cycles)			
	I.C[1)]	N1	N2	判定
1 (31.7)	34	34	36	P
2 (33.3)	34	34	36	P
3 (22.8)	N.D.	22	26	P
4 (26.3)	35	31	31	P
5 (37.6)	35	N.D.	N.D.	**N**
6 (21.0)	N.D.	21	21	P
7 (14.6)	N.D.	17	17	P
8 (36.4)	35	33	33	P
9 (30.2)	35	35	35	P
10 (35.1)	35	33	33	P
11 (26.6)	35	33	33	P
12 (35.0)	35	37	N.D.	P
13 (36.8)	35	37	37	P
14 (38.8)	35	N.D.	39	P
15 (31.7)	35	37	N.D.	P
16 (37.6)	35	31	31	P
17 (33.3)	35	37	40	P
18 (33.5)	35	33	33	P
19 (24.3)	N.D.	25	25	P
20 (29.8)	35	33	33	P
21 (33.4)	35	35	35	P
22 (32.4)	35	37	37	P
23 (31.9)	35	37	37	P
24 (24.8)	35	29	29	P
25 (27.5)	35	29	29	P
26 (38.1)	35	N.D.	39	P
27 (32.6)	35	35	35	P
28 (37.7)	35	37	39	P
29 (32.0)	35	37	39	P
30 (28.1)	35	28	28	P

N.D., not detected; P, Positive; N, Negative

考　察

本キットでは、RNA の抽出に必要な検査時間が飛躍的に短縮されており、全体の検査時間は 70 分で完了することができた。一方、IC は 4 検体で検出できなかったが、いずれの検体についても Ct 値が低い検体であった。このことから、ウイルス量の多い検体では IC が検出できず、改善の余地があると考えられた。

今回の検討では、従来法である RT-qPCR との最終的な検査一致率は 96.7%と良好であり、診断特異度についても 100%であった。しかしながら、本研究では採取されたスワブを 200 μL PBS で懸濁した残余を使用したが、実際にはより多くの量のウイルス保存液で懸濁・保存されることも考えられる。この場合、SARS CoV-2 検出感度が低下する可能性もあるためさらなる検証が必要ではないかと考えた。本キットは、SARS CoV-2 の遺伝子検出の検査時間を飛躍的に短縮でき、PCR 検査体制の増強に寄与する可能性が高いと期待できる結果であった。

文　献

1)　国立感染症研究所 病原体検出マニュアル (https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf)

2020 年 5 月 12 日公開