

遺伝子検査

⑰新型コロナウイルス核酸検査

⑰ 遺伝子検査

【はじめに】

COVID-19 のパンデミックにより、急速に多くの医療機関において多種多様な方法にて新型コロナウイルス遺伝子検査が実施されるようになった。新型コロナウイルスの外部精度管理調査は、厚労省による「新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等にかかる精度管理調査」が実施されているが、各都道府県レベルでの調査は現時点では広く実施されていない。

昨年度に引き続き、兵庫県における検査の実施状況の把握と検査の質の改善を目的とし、新型コロナウイルス遺伝子検査の精度管理調査を実施する。

【実施項目】

新型コロナウイルス遺伝子検査

【試料および方法】

(1) 配布試料は以下の4種類である。

1) 試料名: V1

製品名: AcroMetrix Multi-Analyte SARS-CoV-2, Flu A/B and RSV A/B Control

内容物: 不活化した新型コロナウイルス (10,000 copies/mL = 10 copies/ μ L)

製造メーカー: ThermoFisher SCIENTIFIC

2) 試料名: V2

製品名: DEPC treated Water

内容物: DEPC 処理水

製造メーカー: 日本ジーン

3) 試料名: R1

製品名: AcroMetrix Coronavirus 2019 (COVID-19) RNA Control, EASY Dilution

内容物: EAST Dilution にて希釈調製した新型コロナウイルス由来 RNA (10 copies/ μ L)

製造メーカー: ThermoFisher SCIENTIFIC, タカラバイオ

4) 試料名: R2

製品名: DEPC treated Water

内容物: DEPC 処理水

製造メーカー: 日本ジーン

(2) 配付試料は検査方法により、3種類のパターンを用意した。

1) 試料 V1, V2, R1, R2 配布の対象施設 (グループ A)

- ①カラムや磁性ビーズなどで抽出した核酸を用いて核酸増幅を実施している施設
- ②キット付属の試薬などで抽出(簡易抽出)した核酸を用いて核酸増幅を実施している施設(LAMP 法以外)

2) 試料 V1, V2 配布の対象施設 (グループ B)

- ①全自動核酸増幅装置を用いて実施している施設(TRCReady-80 以外)

3) 試料 R1, R2 の配布対象施設 (グループ C)

- ①Loopamp ウィルス RNA 抽出試薬で抽出(簡易抽出)した核酸を用いて LAMP 法を実施している施設
- ②TRCReady-80 を用いて実施している施設

一部の全自動核酸増幅装置を除き、工程の途中で RNA を試料として添加することが不可能であり、R1, R2 を使用できないため V1, V2 のみの配布とした。ただし、昨年度の精度管理調査において、全自動核酸増幅装置である TRCReady-80 は、V1 に含まれるマトリックスが核酸抽出効率を低下させ、メーカー指定検出感度以下となることが判明したので、R1, R2 を配布し検出モードにて核酸増幅工程のみを評価することとした。また、簡易抽出した核酸を用いて LAMP 法にて検査を実施する場合、核酸の抽出段階で試料 V1 が高度に希釈され、検出不可能であることが事前調査で判明しているため、昨年度と同様 R1, R2 のみを配付し核酸増幅工程のみを評価することとした。日常検査において、多くの試薬キットでは検体採取した綿棒やスワブを試薬に直接添加するプロトコールであるが、綿棒やスワブに配付試料を吸着させることにより大幅なロスが発生するため、配付試料を試薬に直接添加するよう実施の手引きに記載した。

【参加施設数】

グループ A: 18 施設

グループ B: 26 施設

グループ C: 18 施設

計 62 施設

【解析方法】

各種方法別に A 評価施設数、C 評価施設数を評価した。

【評価基準】

A 評価: V1(陽性), V2(陰性), R1(陽性), R2(陰性)のすべてを満たす

C 評価: V1(陰性), V2(陽性), R1(陰性), R2(陽性)のいずれかに該当する

【解析結果】

表 1 に新型コロナウイルス遺伝子検査の検査方法(試薬)別の測定結果を示した。当初の評価基準では、62 施設中 A 評価は 60 施設(96.8%)、C 評価は 2 施設(3.2%)であった。C 評価の内訳はミュータスワコーg1(全自動)が 2 施設であり、試料 V1 が検出されなかった。2 施設とも正しい手順で検査を実施しており、手技に起因するものではなかった。製造元である富士フイルム和光純薬株式会社の社内検証では、配付試料中に含まれるマトリックスが核酸抽出効率を低下させ、メーカー指定検出感度以下となったとのことであり、昨年度の TRCReady-80 と同様の事象である可能性がある。本精度管理の目的は、手技の評価のみでなく、使用している装置・試薬の性能を含めたトータル評価ではあるが、試料中のマトリックスが大きく影響している点を鑑み、今回は対象外に評価を変更した。ただし、臨床検体においても様々な阻害物質が存在しており、臨床検体中の阻害物質が核酸抽出や核酸増幅に与える影響が懸念される。ミュータスワコーg1 の製造元である富士フイルム和光純薬株式会社や TRCReady-80 の製造元である東ソー株式会社に対しては試薬の改良を要望している。試料 V2、R1、R2 は、すべての施設が A 評価であり、偽陽性および逆転写・遺伝子増幅の不良は認めなかった。LAMP 法(簡易核酸抽出)は試料 R1 では参加全施設で A 評価であり、増幅過程は良好であるが、簡易核酸抽出を実施した場合にはウイルス濃度が計算上では 0.24 copies/ μ L(42 倍希釈)となるため、試料 V1 は検出不能となる。簡易核酸抽出法は核酸精製法に比して、検出感度が大きく低下することを実施施設は認識しておく必要がある。

表 1.新型コロナウイルス遺伝子検査の検査方法(試薬)別の測定結果

検査方法(試薬)	施設数	V1:A 評価	V2:A 評価	R1:A 評価	R2:A 評価
LAMP 法(簡易核酸抽出)	11	-	-	11	11
SARS コロナウイルス核酸キット ID NOW(全自動)	8	8	8	-	-
TRCReady SARS-CoV-2i(全自動)	7	-	-	7	7
Ampdirect2019-nCoV 検出キット	5	5	5	5	5
スマートジーン SARS-CoV-2(全自動)	3	3	3	-	-
コバス SARS-CoV-2(全自動)	1	1	1	-	-
HQ SARS-CoV-2(全自動)	1	1	1	-	-
Xpert Xpress SARS-CoV-2(全自動)	2	2	2	-	-
SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	2	2	2	2	2
感染研法	3	3	3	3	3
HQ SARS-CoV-2	6	6	6	6	6
ミュータスワコー COVID-19(全自動)	2	-	2	-	-
Liat SARS-CoV-2 & FluA/B(全自動)	3	3	3	-	-
BD MAX(全自動)	2	2	2	-	-
呼吸器パネル 2.1(FilmArray)(全自動)	3	3	3	-	-
DetectAmp SARS-CoV-2 RT-PCR キット	1	1	1	1	1
LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 PCR Kit(全自動)	1	1	1	-	-
LightMix Modular SARS-CoV(COVID-19) E-gene	1	1	1	1	1

【まとめ】

新型コロナウイルス遺伝子検査の検出感度は、①測定に用いるサンプル量、②核酸精製の有無と精製方法、③逆転写反応・遺伝子増幅に用いる RNA 量、試薬の性能、反応温度条件、④プライマー・プローブ配列、⑤測定機器の性能、⑥陽性の判定基準、など様々な要素により異なる。今回配布した試料 V1(不活化したウイルス)は 10 copies/ μ L、試料 R1(新型コロナウイルス由来の RNA)は 10 copies/ μ L であり、メーカー公表の検出感度であれば十分検出可能な濃度である。ウイルス量の指標となる Ct 値は、感染研法では試料 V1 が 31.26、試料 R1 が 32.08 であった。発症後期かつ Ct 値が 30 を超える場合、ウイルスの感染性は限定的であるという報告があるため、Ct 値 30 付近を確実に検出できる測定系を用いることが望ましい。上述したように、遺伝子検査の検出感度は種々の要素により異なるので、検査導入時に自施設で検出感度試験や再現性の評価を十分に行なうことを推奨する。また、検査手順や精度管理方法を記載した標準作業手順書を作成し、日々の検査精度を保証する取り組みを実施していただきたい。

文責：神戸市立医療センター中央市民病院 丸岡隼人

【参加施設評価一覧】

施設番号	V1		V2		R1		R2		核酸抽出		核酸増幅	
	判定	評価	判定	評価	判定	評価	判定	評価	試薬	機器	試薬	機器
9280153					陽性	A	陰性	A	LoopampウイルスRNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280059	陽性	A	陰性	A					HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9280265	陽性	A	陰性	A					BD MAX SARS-CoV-2	BD MAX	BD MA SARS-CoV-2	BD MAX
9280007	陽性	A	陰性	A					BD MAX SARS-CoV-2	BD MAX	BD MA SARS-CoV-2	BD MAX
9280334	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280060					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280083	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	未使用	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	CFX96 Touch Deep Well
9280146	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	未使用	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	CFX96 Touch Deep Well
9280251	陽性	A	陰性	A					コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat	コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat
9280169					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280130	陽性	A	陰性	A					コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat	コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat
9280091	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	未使用	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	cobas Z480

施設番号	V1		V2		R1		R2		核酸抽出		核酸増幅	
	判定	評価	判定	評価	判定	評価	判定	評価	試薬	機器	試薬	機器
9280100	陽性	A	陰性	A					スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene	スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene
9780021	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9270069					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280160	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280315					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280035	陽性	A	陰性	A					スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene	スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene
9280209	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280125	陽性	A	陰性	A					Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert	Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert
9280350					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280171	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280237	陽性	A	陰性	A					コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat	コバスLiat SARS- CoV-2 & FluAB	Liat
9280482					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280051	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	Maxwell® RSC Instrument	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix	CFX96 Touch
9280390	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	Maxwell® RSC Instrument	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix	CFX96 Touch Deep Well
9280115					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280047	陰性	対象 外	陰性	A					ミュータスワコー COVID-19	ミュータス ワコーg1	ミュータスワコー COVID-19	ミュータス ワコーg1
9280020					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280092	陽性	A	陰性	A					HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9780060	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 12gC	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9280192	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW

施設番号	V1		V2		R1		R2		核酸抽出		核酸増幅	
	判定	評価	判定	評価	判定	評価	判定	評価	試薬	機器	試薬	機器
9280143	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 12gC	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9280206	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 12gC	LightMix Modular SARS-CoV (COVID-19) E-gene	cobas Z480
9280002	陽性	A	陰性	A					HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9280117					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280095					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280003	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	Maxwell® RSC Instrument	One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix	CFX96 Touch
9280124	陰性	対象外	陰性	A					ミュータスワコー COVID-19	ミュータスワコーg1	ミュータスワコー COVID-19	ミュータスワコーg1
8000033	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	QIAamp Viral RNA Mini Kit	未使用	DetectAmp SARS-CoV-2 RT-PCRキット	7500 Fast Dx
9280314					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280033					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9280017	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	未使用	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	CFX96 Touch Deep Well
9280503	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	未使用	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	CFX96 Touch Deep Well
9280099	陽性	A	陰性	A					呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch	呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch
9280067					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9780032	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	未使用	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	CFX96 Touch
9280148	陽性	A	陰性	A					呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch	呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch
9280140					陽性	A	陰性	A	Loopampウイルス RNA抽出試薬	未使用	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
9780047	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280001	陽性	A	陰性	A					コバスSARS-CoV-2	cobas6800	コバスSARS-CoV-2	cobas6800
9280149	陽性	A	陰性	A					呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch	呼吸器パネル2.1	FilmArray Torch

施設番号	V1		V2		R1		R2		核酸抽出		核酸増幅	
	判定	評価	判定	評価	判定	評価	判定	評価	試薬	機器	試薬	機器
9280280	陽性	A	陰性	A					Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert	Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert
9280539	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW	SARSコロナウイ ルス核酸キット ID NOW新型コロナ	ID NOW
9280012	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 12gC	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9280114					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280405					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280509	陽性	A	陰性	A					スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene	スマートジーン SARS-CoV-2	Smart Gene
9280098					陽性	A	陰性	A	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280155	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	未使用	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	LightCycler96
9780014	陽性	A	陰性	A					MagDEA Dx SV	geneLEAD Ⅷ	LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 PCR Kit	geneLEAD Ⅷ
9280038	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 12gC	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE