

遺伝子検査

⑰新型コロナウイルス核酸検査

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。

新型コロナウイルス遺伝子検査の結果は、COVID-19 の診断のみならず社会全体に及ぼす影響が極めて大きいため、各医療機関は正確な検査結果を報告する義務がある。今回、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運びとなった。

【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

3) 試料 R1, R2 の配布対象施設 (グループ C)

- ①Loopamp ウイルス 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

全自動核酸増幅装置を用いて検査を実施する場合、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。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, V2 が高度に希釈され、検出が不可能であることが事前調査で判明しているため、R1, R2 のみの配布とした。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: 21 施設

グループ B: 38 施設

グループ C: 14 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

B 評価: 該当なし

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。73施設中A評価は69施設(94.5%)、C評価は4施設(5.5%)であった。C評価の内訳はTRCReady SARS-CoV-2i(全自動)が3施設(7施設中)、ミュータスワコーCOVID-19(全自動)が1施設(3施設中)であり、試料V1が検出されなかった。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。TRCReady SARS-CoV-2i(全自動)でC評価となった3施設においては、正しい手順で検査を実施しており、手技によるものではなかった。製造元である東ソー株式会社およびThermoFisher SCIENTIFICと協議した結果、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ため、結果にバラツキが生じることが判明した。実臨床検体において同様の影響があるかは不明であるが、東ソー株式会社には製品の改善を要望した。また、ミュータスワコーCOVID-19(全自動)でC評価となった1施設においては、試料到着から測定までに5日経過しており、試料の劣化が原因の1つである可能性がある。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。一方、核酸精製を実施している1施設では試料V1、R1ともに検出されていた。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)	14	-	-	14	14
SARSコロナウイルス核酸キット ID NOW(全自動)	9	9	9	-	-
TRCReady SARS-CoV-2i(全自動)	7	4	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)	5	5	5	-	-
LAMP法(核酸精製)	1	1	1	1	1
HQ SARS-CoV-2(全自動)	4	4	4	-	-
Xpert Xpress SARS-CoV-2(全自動)	4	4	4	-	-
SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	3	3	3	3	3
感染研法	3	3	3	3	3
HQ SARS-CoV-2	3	3	3	3	3
ミュータスワコー COVID-19(全自動)	3	2	3	-	-
Ampdirect2019-nCoV検出キット(全自動)	3	3	3	-	-
コパス SARS-CoV-2&FluA/B(全自動)	2	2	2	-	-
SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	2	2	2	2	2
BD MAX(全自動)	1	1	1	-	-
呼吸器パネル 2.1(FilmArray)(全自動)	1	1	1	-	-
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 31.24、試料 R1 が 32.81 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。今回参加した 73 施設中 69 施設は A 評価であり、結果はおおむね良好であると判断するが、一部の測定系においては十分な検出感度を有していないことが明らかとなった。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
9280162	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
8000035	陽性	A	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
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
9280129	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MagDEA Dx SV	magLEAD 6gC	LOOPAMP 新型コロナウイルス 2019検出キット	LOOPAMP
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
9280169	陰性	C	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

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
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
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
9280278	陽性	A	陰性	A					Ampdirect 2019-nCoV検出キット	AutoAmp	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	AutoAmp
9270069	陽性	A	陰性	A					TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280010	陰性	C	陰性	A					TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280160					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
9280315	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
9280035				A	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
9280209	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	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新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW
9280405	陰性	C	陰性	A					TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280237	陽性	A	陰性	A					Ampdirect 2019-nCoV検出キット	AutoAmp	Ampdirect 2019-nCoV検出キット	AutoAmp
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
9280237	陽性	A	陰性	A					HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
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
9780105	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	未使用	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	クロノスター 96
9280178	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW
9280192	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	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
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	C	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					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
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
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
9280289					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
9280042	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	未使用	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	TP990
9280124	陽性	A	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
9280187	陽性	A	陰性	A					Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert	Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert
8000033	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	MGEasy Nucleic Acid Extraction 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
9280251					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
9280529	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
9280371	陽性	A	陰性	A					SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW
9280223	陽性	A	陰性	A					Ampdirect 2019- nCoV検出キット	AutoAmp	Ampdirect 2019- nCoV検出キット	AutoAmp
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
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
9780045	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
9280358	陽性	A	陰性	A					Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert	Xpert Xpress SARS-CoV-2	GeneXpert
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
9280001	陽性	A	陰性	A					コバスSARS-CoV- 2&FluA/B	cobas6800	コバスSARS-CoV- 2&FluA/B	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
9280191	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
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新型コロナウイルス	ID NOW	SARSコロナウイルス 核酸キット ID NOW新型コロナウイルス	ID NOW
9280012	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	LightCycler nano	SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-	LightCycler96
9280114	陽性	A	陰性	A					TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80	TRCReady SARS-CoV-2i	TRCReady80
9280486	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
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
9280155	陽性	A	陰性	A	陽性	A	陰性	A	HQ SARS-CoV-2	未使用	HQ SARS-CoV-2	GENE CUBE
9780014	陽性	A	陰性	A					MagDEA Dx SV	geneLEAD VIII	LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 PCR Kit	geneLEAD VIII
9280135					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