

●原 著

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

若松謙太郎^a 香月 耕多^b 池田 哲治^b 上野 剛史^a 清谷るりこ^a
 福井いづみ^a 榎 早苗^a 永沢 善三^c 永田 忍彦^d 川崎 雅之^a

要旨：「スマートジーン®新型コロナウイルス検出試薬」(株式会社ミズホメディアー)について、COVID-19確定患者および疑い患者128例(147検体)を対象に評価を行った。国立感染症研究所のRT-PCRを対照としたとき、感度98.3%(59/60)、特異度98.9%(86/87)、検出感度は、SARS-CoV-2 RNAとして約10コピー/テストであった。本試薬は、簡易な測定操作で検査が可能であり、これまで遺伝子検査の導入が困難であった医療機関等への導入が期待される。

キーワード：新型コロナウイルス感染症, 新型コロナウイルス, PCR

Coronavirus disease 2019 (COVID-19),

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), Polymerase chain reaction

緒 言

新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019: COVID-19) は、新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2: SARS-CoV-2) による急性の呼吸器感染症である¹⁾。

COVID-19の臨床的特徴については、中国疾病予防管理センターが2020年2月11日までに収集した確定例44,672例において、81%が軽症(肺炎なし、もしくは軽度肺炎)、14%が重症(呼吸困難など)、5%が致命的(呼吸不全、敗血症性ショック)であった。全体の死亡率は2.3%であり、9歳以下での死亡例はなく、70~79歳のグループでは死亡率8.0%、80歳以上のグループでは死亡率14.8%であった²⁾。

わが国でのCOVID-19への対策としては、2020年2月7日に指定感染症に定める政令が施行され³⁾、国を挙げた対策がとられてきた。検査体制については、同年2月に国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1.」に記載のTaqManプローブを用いたリアルタイム one-step reverse transcription PCR (RT-PCR) 法

(感染研法RT-PCR)⁴⁾が保健所・地方衛生研究所にて広く実施されるようになり、感染研法RT-PCRが標準法と位置づけられることとなった⁵⁾。同年3月6日には、COVID-19のPCR検査が保険適用され⁶⁾、その後のメーカー等が提案する新たな遺伝子検査法は感染研法RT-PCRとの比較評価にてその性能が確認される流れとなった⁷⁾。

上記背景のもと、わが国でのCOVID-19の診断については、鼻咽頭ぬぐい検体、唾液などの検査材料を用いて、病原体遺伝子検査 [RT-PCR法、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法など]、または抗原検査を行い、陽性となった場合には診断が確定する⁸⁾⁹⁾。各検査法の検出感度には限界があることに注意が必要であり、RT-PCR法の偽陰性率について算出した研究では、最も偽陰性率の低い感染後8日(発症後3日)でも20%の偽陰性率が算出された¹⁰⁾。COVID-19の診断については、検査結果に加え、臨床像を併せて総合的に判断することが重要である。

病原体遺伝子検査は、抗原検査よりも高感度である一方、短所として検査時間が長い(1~5時間)、専用の機器および熟練した人材が必要、高コストなどが挙げられる⁸⁾。今回、簡易な測定操作方法で遺伝子検査が可能な全自動遺伝子解析装置Smart Gene®(株式会社ミズホメディアー)¹¹⁾の専用試薬として、「スマートジーン®新型コロナウイルス検出試薬(評価試薬スマートジーン®)」(株式会社ミズホメディアー)が新たに開発された。このキットは、RT-PCR法とQProbe™法を原理とする。QProbe™は、末端のシトシンが蛍光色素で標識されており、標的配列に結合すると消光するハイブリダイゼーションプ

連絡先：若松 謙太郎

〒837-0911 福岡県大牟田市大字橋1044-1

^a 国立病院機構大牟田病院呼吸器内科

^b 同 検査科

^c 国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科

^d 福岡山王病院呼吸器内科

(E-mail: wakamatsu.kentaro.fe@mail.hosp.go.jp)

(Received 20 Nov 2020/Accepted 2 Mar 2021)

Table 1 Details of patient backgrounds

	COVID-19 confirmed	COVID-19 suspicion	Total
Number of patients	58	70	128
Number of sample collections	73	74	147
Number of positive sample*	60	0	60
Age (median, range)	36.0, 11-82	66.5, 12-97	51.0, 11-97
Men : Women	38 : 20	36 : 34	74 : 54
Days from onset to sample collection (median, range)	5.0, 1-45	4.0, 1-18	4.0, 1-45

*: Determined by RT-PCR (nasopharyngeal swab).

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction.

ローブであり、SARS-CoV-2 RNAはRT-PCRにより増幅され、QProbe™の消光により検出される。鼻咽頭ぬぐい検体をキット専用の抽出液に懸濁した後、テストカートリッジに滴下するだけのワンステップにて、SARS-CoV-2 RNAの核酸精製・増幅・検出までを全自動で約60分以内に実施することができる。我々は、COVID-19の確定患者および疑い患者より採取した鼻咽頭ぬぐい検体を対象に、わが国の標準法である感染研法RT-PCR⁴⁾を対照としたときの評価試薬の感度（陽性一致率）、特異度（陰性一致率）の評価を行った。

研究対象と方法

1. 研究対象

2020年4～10月の期間に国立病院機構大牟田病院を受診した患者のうち、PCR検査もしくは抗原検査にて確認されたCOVID-19確定患者58例（73検体）、および当院外来にて主治医がCOVID-19を疑った患者70例（74検体）、計128例（147検体）を対象とした。評価試薬スマートジーン®の検査対象であることを設定根拠とし、COVID-19確定患者および疑い患者を対象として設定した。一部の患者からは、複数回の検体採取を行った。確定患者より採取した検体には、陰性確認の検査も含まれており、73検体のうち陽性数は60検体であった。評価においては、同一日時に採取した検体（鼻咽頭ぬぐい検体、唾液検体）を用いて比較評価を行った。患者背景の詳細をTable 1に示す。患者背景の分類について、COVID-19の診断が確定した者から採取した検体は、検査結果によらずすべて確定患者として分類した。また、COVID-19疑い患者として分類された患者はすべて、その後の経過を含めてCOVID-19とは診断されなかった。発症から検体採取までの日数は、検体ごとのデータを用いた。

対象患者より鼻咽頭ぬぐい検体を採取し、さらに患者の同意が得られた場合には、唾液検体を患者本人による自己採取にて採取した。これらの検体を用いて、評価試薬スマートジーン®の測定を行った。また、対照法とし

て、評価試薬スマートジーン®の試料残液を用い、感染研法RT-PCRの測定を行い、対照法に対して偽陽性となった検体についてはCDC法RT-PCRによる精査を行った。さらに、通常診療において、主治医が迅速性の点から、臨床上、抗原検査を必要と判断した場合には、別途に鼻咽頭ぬぐい検体を採取し、SARSコロナウイルス抗原キット「エスプライン®SARS-CoV-2」（富士レビオ株式会社¹²⁾により、添付文書の記載に従い測定を行った。本研究は国立病院機構大牟田病院の倫理委員会にて承認を受けて実施した（承認番号：2-14）。

2. スマートジーン®新型コロナウイルス検出試薬（鼻咽頭ぬぐい検体）

評価試薬スマートジーン®は、核酸精製・増幅・検出に必要なすべての試薬を内蔵したテストカートリッジと、専用抽出液により構成される。測定操作は付属の取扱説明書に従い実施した。患者より、キット推奨の滅菌綿棒（ニプロスポンジスワブ® TYPE R, ニプロ株式会社）を用いて鼻咽頭ぬぐい検体を採取し、専用抽出液に懸濁した後、テストカートリッジに4滴（約110μL）滴下し、専用機器にて測定を行った。核酸の精製、逆転写反応、PCRは全自動で行われる。PCRは最大で45サイクル実施され、23サイクルより閾値を超えた時点で陽性と判定される。

3. スマートジーン®新型コロナウイルス検出試薬（唾液検体）

唾液検体は、患者本人による自己採取にて、50mLの滅菌チューブを用いて流涎を約1mL採取した。得られた唾液検体を、キット推奨の滅菌綿棒（ニプロスポンジスワブ® TYPE R）を用いて採取し、専用抽出液に懸濁した後、テストカートリッジに4滴（約110μL）滴下し、専用機器にて測定を行った。

4. 対照法の測定（感染研法RT-PCR, CDC法RT-PCR）

鼻咽頭ぬぐい検体、および唾液検体について、評価試薬スマートジーン®の試料残液をサンプルとした。試料残液140μLより、QIAamp® Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）を用いてRNA抽出を行い、精製RNA 60μLを得た。

Table 2 Evaluation result of Smart Gene® using nasopharyngeal swab

		Smart Gene® (nasopharyngeal swab)		
		Positive	Negative	Total
RT-PCR (nasopharyngeal swab)	Positive	59	1	60
	Negative	1	86	87
	Total	60	87	147

Table 3 Comparison of Smart Gene® with antigen test

		Smart Gene® (nasopharyngeal swab)		
		Positive	Negative	Total
Antigen test (nasopharyngeal swab)	Positive	47	1	48
	Negative	11	67	78
	Total	58	68	126

得られた精製RNA 5 μ Lを用いて、国立感染症研究所の公開する感染研法RT-PCR (N2セット)⁴⁾を実施した。サンプルの測定と同時に、「新型コロナウイルス陽性コントロールRNA 2種/1セット」(株式会社日本遺伝子研究所)の希釈系列の測定を行った。陽性判定サイクル数(Ct値)とRNAコピー数の検量線を作成し、サンプルのCt値よりRNAコピー数を相対定量した。また、対照法に対して偽陽性となった例について、米国疾病予防管理センター(CDC)の公表するCDC法RT-PCR法(N2セット)¹³⁾による精査を行った。

5. 統計解析

鼻咽頭ぬぐい検体と唾液検体中のSARS-CoV-2 RNAコピー数の相関係数はピアソンの相関係数にて算出し、母相関係数の無相関の検定を行った。また、この2種類の平均値の検定は、t検定にて行った。各検体の正規性については、ダゴステーノ検定およびオムニバス検定により確認した。すべての統計解析は、エクセル統計Bell-Curve for Excel (バージョン3.21, 株式会社社会情報サービス)を用いて行った。

成 績

1. 鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®の成績

鼻咽頭ぬぐい検体を用いた感染研法RT-PCRを対照としたとき、鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®の感度は98.3% (59/60)、特異度は98.9% (86/87)、全体一致率は98.6% (145/147)であった(Table 2)。感染研法RT-PCRの対照法に対して偽陰性となる不一致例は、感染研法RT-PCRにて7.6コピー/テストの薄い遺伝子量の検体であった。

主治医が臨床上必要と判断した場合に実施した、

SARS-CoV-2抗原定性検査を対照としたとき、鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®の感度は97.9% (47/48)、特異度は85.9% (67/78)、全体一致率は90.5% (114/126)であった(Table 3)。抗原定性検査の対照法で陰性、評価試薬スマートジーン®で陽性となった11例のうち、10例は感染研法RT-PCRで陽性、1例は感染研法RT-PCR陰性、CDC法RT-PCR陽性であった。抗原定性検査の対照法で陽性、評価試薬スマートジーン®で陰性となった1例は、感染研法RT-PCR、CDC法RT-PCRともに陰性であった。

鼻咽頭ぬぐい検体を用いた感染研法RT-PCRにて相対定量した、SARS-CoV-2 RNAのコピー数分布をFig. 1に示す。

2. 唾液検体を用いた評価試薬スマートジーン®の成績

鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®を対照としたとき、唾液検体を用いた評価試薬スマートジーン®の感度は87.9% (51/58)、特異度は100.0% (64/64)、全体一致率は94.3% (115/122)であった(Table 4)。鼻咽頭ぬぐい検体を用いた対照法に対して偽陰性となった不一致例7例のうち、6例は鼻咽頭ぬぐい検体を用いた感染研法RT-PCRの結果は陽性、1例は感染研法RT-PCR陰性、CDC法RT-PCR陽性であった。

唾液検体と鼻咽頭ぬぐい検体の検体種の比較について、感染研法RT-PCRによるSARS-CoV-2 RNAのコピー数分布をFig. 2に示す。検体種2種類の間の相関性について、ピアソンの相関係数は0.5059であり、母相関係数の無相関の検定を行った結果、相関性が認められた($p < 0.001$)。また、検体種2種のRNAコピー数の平均値の相違について、t検定の結果、有意差が認められた($p < 0.001$)。唾液検体中のSARS-CoV-2 RNAコピー数は、鼻咽頭ぬぐい検体と比較して同等以下であり、検体によ

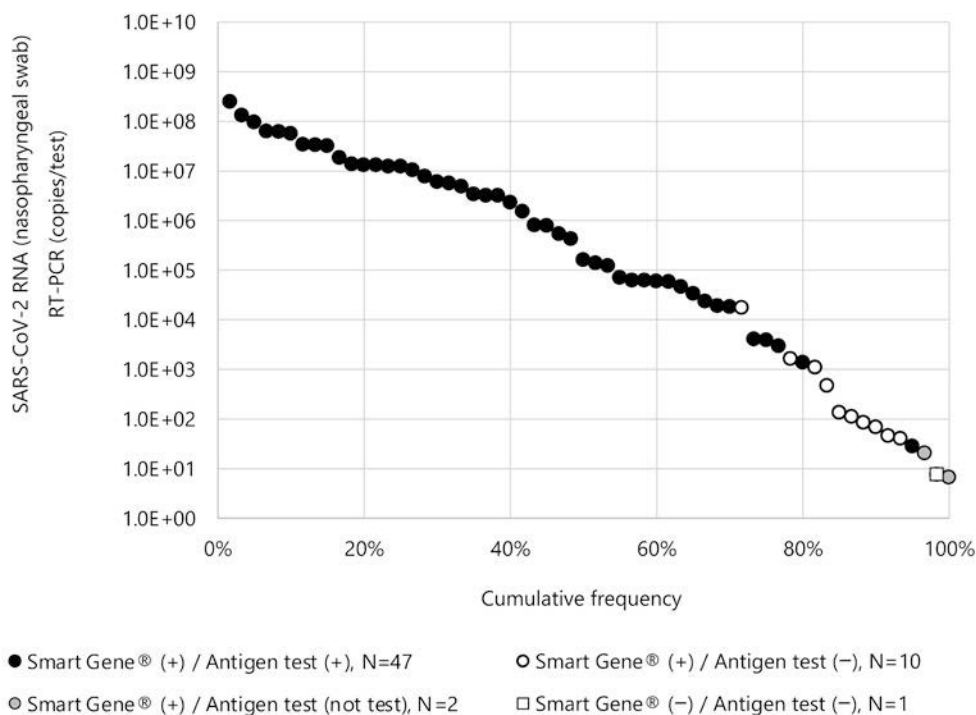


Fig. 1 Concentration of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swab samples by determination of RT-PCR copy number. The distribution of SARS-CoV-2 RNA copy numbers in nasopharyngeal swab positive samples taken by RT-PCR is shown. The results of the Smart Gene® and antigen tests show the detection sensitivity of each method.

Table 4 Evaluation result of Smart Gene® using saliva

		Smart Gene® (saliva)		
		Positive	Negative	Total
Smart Gene® (nasopharyngeal swab)	Positive	51	7	58
	Negative	0	64	64
	Total	51	71	122

ては、数桁の差がみられた。

考 察

COVID-19のわが国での診断は、病原体遺伝子検査が広く使用される⁸⁾。わが国で使用される具体的なCOVID-19の病原体遺伝子検査試薬としては、リアルタイムPCR法を原理とする「コバス® SARS-CoV-2」(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)¹⁴⁾、LAMP法を原理とする「Loopamp® 新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キット」(栄研化学株式会社)¹⁵⁾等が挙げられる。前者は、大量の検体をハイスループットに検査可能であるが、専用の大型機器を必要とし、機器価格は約8,000万円、試薬が115万円(192テスト)と高額であるため、主に検査センターにて使用される。後者は、数検体の少数検体にも対応でき、専用の測定機器が約200万円、試薬

が76,800円(48テスト)で購入可能であるため、検査室を擁する中規模病院でも導入されている。ただし、前処理としてRNA抽出を行うためのキット購入と、作業が用手法であることから、熟練した専門の検査技師を必要とする。

今回評価した、評価試薬スマートジーン®は、核酸精製・増幅・検出に必要なすべての試薬がテストカートリッジに内蔵されており、測定操作は調製した試料をテストカートリッジに滴下するのみのワンステップである。専用機器にて測定を開始した後、約60分以内に結果は自動的に判定される。専用の測定機器が約50万円、テストカートリッジが40,000円(5テスト)、専用の抽出液セットが6,000円(10テスト)で購入可能である。測定操作については、既存の病原体遺伝子検査試薬に比べて簡易であり、優位性が高いと考えられた。

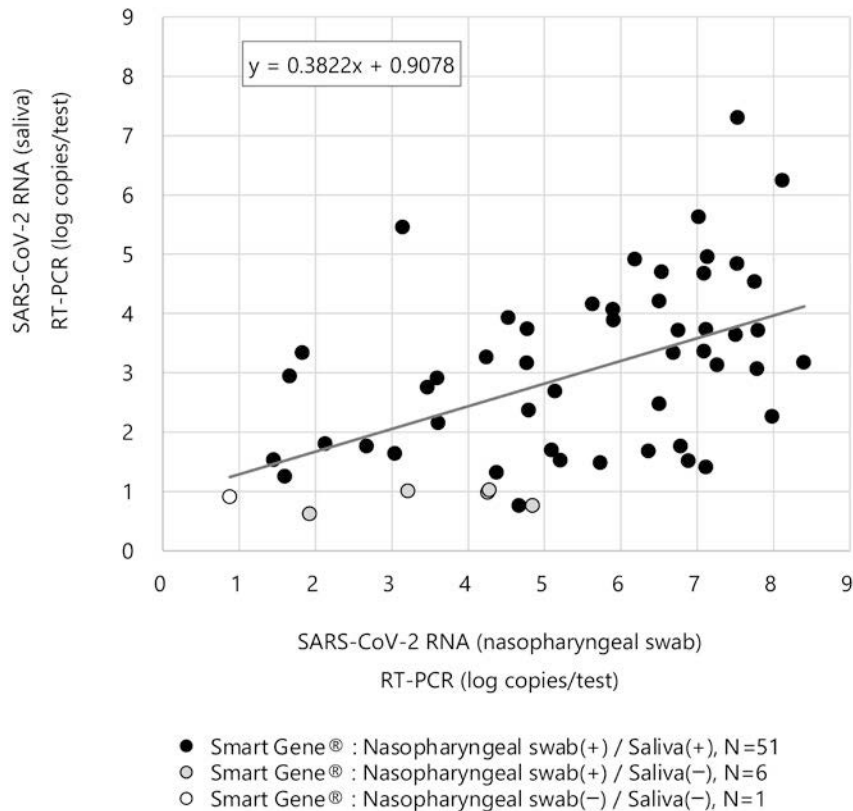


Fig. 2 Comparison of saliva samples with nasopharyngeal swab samples by RT-PCR copy number determination. The SARS-CoV-2 RNA copy numbers were quantified for each of the nasopharyngeal swab and saliva samples. The relationship between RNA copy numbers in each sample was shown.

鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®について、感染研法RT-PCRを対照に評価した結果、感度は98.3% (59/60)、特異度は98.9% (86/87)と、良好な結果が得られた。対照法である感染研法RT-PCRに対して偽陽性となる不一致例については、CDC法RT-PCRでは3.8コピー/テストの陽性となった。これら3法はすべて、nucleocapsid (N) protein 遺伝子を検出対象とすることから、検出対象の相違による不一致ではなく、検出限界濃度付近であるための不一致であると考えられた。また、評価試薬スマートジーン®の検出感度としては、約10コピー/テストまで陽性と判定できると考えられた。

同様に評価した抗原定性検査の検出感度は約1,000コピー/テストまで陽性と判定できると考えられた。今回使用した抗原定性検査キット「エスプライン® SARS-CoV-2」(富士レリオ株式会社)の添付文書に記載された感度としては、行政検査検体を用いたRT-PCR法との試験成績として、1,600コピー/テスト以上の検体に対して一致率100% (12/12)、400コピー/テスト以上の検体に対して一致率93% (14/15)、100コピー/テスト以上の検体に対して一致率83% (15/18)であり¹²⁾、本研究の結果

と一致した。一方で、本研究においては、抗原定性検査には偽陽性と考えられる例がみられており、偽陽性の要因としては検体の粘性が高く抽出操作が不十分な場合などにより生じること、チューブ内での綿球のもみほぐし不足が報告されている⁹⁾。各検査法には感度・特異度に限界があるため、検査法の特徴を理解し、臨床像と併せて総合的に診断することが重要である。

わが国でのCOVID-19の検査材料としては、鼻咽頭ぬぐい検体に加え、唾液検体を使用される。唾液検体は、非侵襲的な検体であり、患者本人による自己採取ができることから医療従事者の感染対策に有用であり、鼻咽頭ぬぐい検体との高い一致率が確認されている¹⁶⁾。唾液検体を用いた評価試薬スマートジーン®について、鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®を対照に評価した結果、感度は87.9% (51/58)、特異度は100.0% (64/64)であった。唾液検体を用いた評価試薬スマートジーン®は、抗原定性検査よりは高感度であるが、鼻咽頭ぬぐい検体を用いた評価試薬スマートジーン®に比べると感度が劣る。検査感度を考慮すると、可能な限り鼻咽頭ぬぐい検体を用いて測定することが望ましいと考え

られる。

感染研法 RT-PCRによる唾液検体の SARS-CoV-2 RNA コピー数は、鼻咽頭ぬぐい検体と比べて同等以下であり、検体によっては、数桁の差がみられた。唾液検体を用いた RT-PCRでの Ct値は、鼻咽頭ぬぐい検体に比べて大きくなる事が報告されている¹⁷⁾。本研究の結果からも、唾液検体中の SARS-CoV-2 RNA量は、鼻咽頭ぬぐい検体と比較して少ないという結果が得られた。一方で、唾液検体中にも鼻咽頭ぬぐい検体と同等以上の SARS-CoV-2 RNAが含まれるとの報告もある¹⁸⁾。唾液検体については、患者本人による自己採取の影響や、個別の症例における発症から採取までの期間の影響が未だ明確にはなっておらず、これらの影響については今後の重要な検討課題と考える。

今回評価した評価試薬スマートジーン[®]は、簡易な測定操作で測定が可能であり、感染研法 RT-PCRとも良好な一致率を示した。さらに、検体処理のステップが少ないため感染リスクは低く、1検体ごとの測定が可能のため検体間のクロスコンタミネーションのリスクも低いと考えられる。これまで遺伝子検査の導入が困難であった医療機関等でも、臨床の現場で幅広く使用されることが期待される。

著者の COI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して申告なし。

引用文献

- 1) Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020; 382: 1199-207.
- 2) Wu Z, et al. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020; 323: 1239-42.
- 3) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令等の施行について (施行通知). 2020年1月28日.
- 4) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1. 2020.
- 5) 厚生労働省. 新型コロナウイルスに関する検査体制の確保について. 2020年2月25日.
- 6) 厚生労働省. 新型コロナウイルス核酸検出の保険適用に伴う行政検査の取扱いについて. 2020年3月4日.
- 7) 厚生労働省. 新型コロナウイルスに関する行政検査の遺伝子検査方法について. 2020年3月18日.
- 8) 厚生労働省 診療の手引き検討委員会. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 診療の手引き 第3版. 2020.
- 9) 厚生労働省 病原体検査の指針検討委員会. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 第3版. 2021.
- 10) Kucirka LM, et al. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Ann Intern Med* 2020; 173: 262-7.
- 11) 長野隆志. Smart Gene[®]の特徴と今後の展開. *臨と微生物* 2020; 47: 350-4.
- 12) 富士レビオ株式会社. SARSコロナウイルス抗原キット「エスプライン[®] SARS-CoV-2」添付文書. 2020年7月改訂 (第8版).
- 13) Centers for Disease Control and Prevention. Research use only 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR primers and probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html> (accessed on March 3, 2021)
- 14) ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社. SARSコロナウイルス核酸キット「コバス[®] SARS-CoV-2」添付文書. 2020年10月改訂 (第4版).
- 15) 栄研化学株式会社. SARSコロナウイルス核酸キット「Loopamp[®] 新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キット」添付文書. 2020年10月改訂 (第4版).
- 16) 加藤康幸. 他. 令和2年度厚生労働行政推進調査事業補助金/新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業. 一類感染症等の患者発生時に備えた臨床的対応に関する研究「新型コロナウイルス感染症の診断における鼻かみ鼻汁及び唾液の有用性の検討」. 2020.
- 17) Williams E, et al. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00776-20.
- 18) Wyllie AL, et al. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383: 1283-6.

Abstract**Clinical performance evaluation of “Smart Gene® SARS-CoV-2 Detection Reagent”**

Kentaro Wakamatsu^a, Kouta Katsuki^b, Tetsuharu Ikeda^b,
Tsuyoshi Ueno^a, Ruriko Kiyotani^a, Izumi Fukui^a, Sanae Maki^a,
Zeno Nagasawa^c, Nobuhiko Nagata^d and Masayuki Kawasaki^a

^aDepartment of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Omuta National Hospital

^bDepartment of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Omuta National Hospital

^cDepartment of Medical Technology and Science, Faculty of Fukuoka Health Care,
International University of Health and Welfare

^dDepartment of Respiratory Medicine, Fukuoka Sanno Hospital

The newly developed “Smart Gene® SARS-CoV-2 Detection Reagent” (Mizuho Medy Co., Ltd.) was evaluated among a total of 128 patients (147 samples) who were either confirmed COVID-19 patients or suspected COVID-19 patients. The evaluation results were as follows: sensitivity 98.3% (59/60) and specificity 98.9% (86/87) compared with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method of the National Institute of Infectious Diseases. In addition, the detection sensitivity was considered to be positive up to about 10 copies/test from the copy number distribution of SARS-CoV-2 RNA. This reagent enables RT-PCR testing of COVID-19 with a simple measurement operation and is expected to be widely used in various medical institutions.