

臨床検査として「SARS-CoV-2 核酸検出」を実施する際に考慮すべき事項

京都大学医学部附属病院 検査部・感染制御部

京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学

2020年3月9日

1. はじめに

SARS-CoV-2 (新型コロナウイルス) 核酸検出検査 (以下、PCR 検査) は、地方衛生研究所 (行政検査として)・衛生検査所 (外注検査として)、また各医療・研究機関において主として国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」(以下、感染研マニュアル、<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov.html> より最新版を参照のこと) に従い実施されてきた。新型コロナウイルス対策の一環として、2020年3月6日より本 PCR 検査が保険適応となり、今後さらに検査件数の増大が見込まれ、診療に貢献するものと考えられる。

このように検査が拡充される中で、検査の質を担保することは診療に用いる臨床検査として極めて重要である。しかし、感染研マニュアルは、PCR 検査に関する標準的な実施方法を示しているのみである。そこで、臨床検査として行う際に考慮すべき事項 (特に**コントロールを用いた精度管理**) について当施設での考え方を公表することで、現在の PCR 検査の問題点を提起するとともに、これから PCR 検査を導入する施設の一助として頂くことを目的として本稿を作成した。

2. 検体採取

国立感染症研究所の「2019-nCoV (新型コロナウイルス) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」を参考にする。検体採取の際はエアロゾルが発生する危険があることから、フェイスシールド・N95 マスク・ガウン・手袋などの个人防护具を適切に使用する¹⁾。

特に、鼻咽頭ぬぐい液・咽頭ぬぐい液などスワブを用いて検体採取を行う場合、採取手技・採取容器・保存方法により偽陰性となりうるものが懸念される。レーヨン繊維を用いた綿棒ではなく、必ずフロックスワブを用いること、採取後すみやかに検体処理を行えない場合は、生理食塩水や PBS ではなくウイルス輸送培地等の適切な保存液を用い冷蔵・冷凍など適切な条件で保存する必要がある。

上記マニュアルでは、当初咽頭スワブを推奨していたが、NEJM の論文²⁾を参考に鼻咽頭スワブのみを用いることとしている。しかし、この論文での検討は限定的で、科学的な見地から咽頭スワブが否定されるものではないため、咽頭スワブを用いた検査も検討できる。また、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液ともに保険算定は可能である。

3. 施設および検査者

現時点では、体外診断用医薬品として承認を得ている検査法はない。したがって、研究用

試薬を組み合わせ、各施設での標準作業手順書を作成し実施する必要がある。また、RNA は DNA と異なり不安定であるため、その取扱いおよび手技に習熟している必要がある。したがって、ISO15189 認定施設および CAP 認定取得施設で、RNA を対象とした核酸増幅検査に関する実績があることが望まれる。

4. RNA 抽出

4.1. 前処理

RNA 抽出が終了するまで（特に、ウイルス溶解を行うまで；Qiagen であれば buffer AVL の添加前まで）は、BSL2 施設内の安全キャビネット内で取り扱う。

喀痰など下気道検体は多くの宿主由来細胞（核酸）を含むため、適切な抽出前処理が行われていない場合、偽陰性となることが知られている。感染研マニュアルに示されている喀痰処理方法等を参考に処理を行う。スプタザイム等の喀痰溶解剤を用い十分に溶解した後、遠心した上清を用いるか、DNase 処理を行う必要がある。

咽頭スワブ等の上気道検体についても、ヒト細胞を除くため 20000g 2 分間の遠心を行うことが考慮される³⁾。

4.2. RNA 抽出

感染研マニュアルでは Qiagen 社の QIAamp Viral RNA Mini Kit が挙げられているが、他の試薬キットも使用可能とされている。ただし、当院で行った検討では Roche 社の MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit、MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I において QIAamp Viral RNA mini kit に比べウイルス抽出効率が劣る可能性が示唆されている（Qiagen 陽性 3 検体中 1 検体のみが Roche の両キットで陽性）。

5. PCR 検査

5.1. 検査原理

Reverse Transcription PCR には、逆転写反応と PCR を別反応で行う 2-step 法と同じチューブで行う 1-step 法がある。また、増幅産物の検出には主として conventional PCR と real-time PCR があるが、hands-on-time と TAT を考えると、1-step real-time PCR 法が望ましい。

PCR の標的遺伝子としては、ウイルス変異の可能性に対応するため、2 遺伝子領域以上を別反応において検出し、双方が陽性であることが望ましい。国立感染症研究所、米国 CDC、中国 CDC、ドイツ、香港大学の開発した検査法では 2 領域以上を用いて判定している。

Nested PCR 法については PCR 反応を 2 回行うため hands-on-time が長くまた TAT が遅延しうること、増幅産物によるコンタミネーションのリスクが高いことより避けるべきと考えられる。

5.2. 保険適応の検査法

現時点で保険算定の対象となっている検査法は、感染研マニュアルおよびこれに準じる

方法であるため、具体的には下記に限定される。

- ① 感染研マニュアル nested PCR 法 (ORF1a、S 遺伝子)
- ② 感染研マニュアル real-time PCR 法 (N 遺伝子の 2 箇所)
- ③ ロシュ社キット real-time PCR 法 (N および E 遺伝子)

① nested PCR 法については PCR 反応を 2 回行うため hands-on-time が長くまた TAT が遅延しうること、増幅産物によるコンタミネーションのリスクが高いことより避けるべきと考えられる。

② 感染研よりプライマー・プローブ+陽性 RNA コントロールのセットが入手可能。プライマー・プローブについては配列が公開されているため合成も可能。

反応酵素については、Qiagen, ABI, Takara, Toyobo 等の試薬が陽性コントロールを用いた検討にて同等とされている。反応条件等は Takara, Toyobo メーカーサイトで情報提供がある。しかし、いずれもコントロールを用いた精度管理は考慮されていない。

N, N2 アッセイの 2 種類を 2 反応ずつ行い、N2 で 1 つ以上の陽性が得られ場合陽性と判定する。ただし、N アッセイの開発元のドイツの論文では、同時に開発された E, RdRP 遺伝子のアッセイに比べ感度に劣るため使用が推奨されておらず、臨床における妥当性確認もされていない⁴⁾。当院での検討では、4 件の N2 アッセイ陽性検体中 N アッセイは 1 件のみで陽性であった。したがって、感度の悪い N アッセイを常に実施する必要性については疑問がある。

国立感染症研究所の「新型コロナウイルス(2019-nCoV)検査法の運用についてのガイドライン第 1 版」においては、検査件数の多い場合や無症状者・退院患者の陰性確認検査等の場合は、1 検体あたり N, N2 アッセイそれぞれを 2 反応行わず、それぞれ 1 反応、あるいは N2 のみ 1 反応も許容されうるとされている。しかし、臨床検査として行う場合は、少なくとも 2 遺伝子領域を 1 反応ずつ行う必要がある。一方のみが陽性の場合は再検を行い、同じ結果であった場合は、判定保留とし、他の検査法での確認・検体採取からの再検・行政検査や他機関での検査等により確認を行う。

③ プライマー・プローブとして LightMix Modular SARS and Wuhan CoV N-gene (518-499914)および LightMix Modular SARS and Wuhan CoV E-gene (518-499921)、増幅試薬として LightCycler Multiplex RNA Virus Master、LightMix Modular EAV RNA Extract. Control(518-219963)を用いる。E また N いずれか陽性であれば陽性と判定される。RNA 抽出時に外部コントロール RNA を混入することで精度の担保が可能。ただし、アッセイはドイツの論文を基本にしており、E 遺伝子での screening と RdRp 遺伝子(LightMix Modular Wuhan CoV RdRP-gene, 518-499938)での確定を前提にしている。

5.3.検査機器

2 波長以上の蛍光に対応したリアルタイム PCR 装置で、下記精度管理の要求事項が満たされれば、どの検査機器を選んでも問題ないと考えられる。ただし、蛍光干渉による偽陽性

等を避けるため、陽性コントロールのための検出波長は、ウイルス標的遺伝子の検出波長と十分離れていることが望ましい。ウイルス標的遺伝子の検出には FAM を用いることが標準的であるが、コントロールを含む他のアッセイが近接する VIC, HEX 等に設定されている場合は十分な注意が必要で、少なくとも色補正は必須である。Roche 社のキットでは、波長が十分離れているため(530 と 660nm)干渉の考慮は不要であるが、一部の機器で検出ができないことに注意が必要である。

5.4.精度管理

体外診断用医薬品がない以上、内部精度管理は極めて重要である。感染研マニュアルでは、N, N2 アッセイともに 50 copies の陽性コントロールが陽性と判定されること、陰性コントロールが陰性と判定されることのみが検査成立の要件とされているが、これに加えて核酸抽出・逆転写反応・PCR 反応が阻害なく行われたことを確認する必要がある。

RNA 抽出を行う際に外来性 RNA を混入し、各アッセイ時にマルチプレックス PCR を用いて検出することで、全てのステップに問題がないことが確認できる。マルチプレックス反応を行った際、ウイルス検出の感度が低下しないよう調整された RNA コントロールとプライマー・プローブのセットが各社より提供されている (Roche 社 LightMix Modular EAV RNA Extract. Control、Thermo Fisher Scientific 社 VetMAX Xeno Internal Positive Controls など)。Roche 社の E, N, RdRP アッセイでは、このコントロールの使用が前提とされており、キット添付の陽性コントロールが陽性、水を用いた陰性コントロールが陰性であることに加え、陰性判定には外部コントロール(EAV Control)が陽性である必要がある。我々の検討では、感染研マニュアルでの N, N2 アッセイと、LightMix Modular EAV RNA Extract. Control、VetMAX Xeno Internal Positive Controls のマルチプレックス反応が可能であることを確認している。

BD 社の BD MAX は全自動 PCR 装置であるが、オープン試薬を用いるとユーザーのプライマー・プローブが使用可能である。これを用いて感染研マニュアルの PCR を実施する方法が東邦大学から公開されている (<http://www.jscm.org/>)。BD MAX のサンプルチューブにはコントロールがすでに付与されており、マスターミックスにもこれを検出するプライマー・プローブが添加されていることから、精度担保が可能である。ただし、公開された方法では N と N2 がマルチプレックス化されていることから、実際の検体を用いた際に性能低下がないことを今後の検討により確認する必要があると考えられる。BD MAX を使用する場合は、現時点では別々のアッセイで実施すべきと思われる。

外来性 RNA を用いない場合、内在性コントロールとしてヒトの house-keeping 遺伝子である RNaseP や NADPH を検出する方法もある (Thermo Fisher Scientific 社 TaqMan RNase P Detection Reagents Kit など)。ただし、ウイルス量が少ない場合、ヒト由来の核酸が多いため検出反応が阻害される可能性があることから、ウイルス遺伝子検出とは別反応で行うことが望ましい。

現時点で本検査に対応可能な外部精度管理は存在しない。したがって、内部精度管理が重要である。

5.5.推奨される検査法

以上より、現時点で推奨される方法としては、下記が挙げられる。

- ・ Roche 社のキット E, N, RdRP 遺伝子のアッセイのうち E, N (感染研マニュアル推奨)、または E, RdRP (メーカー推奨；保険算定不能な可能性あり) および EAV RNA Extract. Control を用いたマルチプレックス real-time PCR

- ・ 感染研マニュアルにおける N, N2 と外来性 RNA コントロール (ABI, Roche 社等) を用いたマルチプレックス real-time PCR または、別反応での RNaseP 等のヒト遺伝子検出

5.6.結果報告

現在利用可能なアッセイとして、SARS-CoV-2 特異的なものと、Sarbecovirus と呼ばれる SARS 様コロナウイルス(SARS-CoV, bat-SARS-CoV, SARS-CoV-2 含む)を検出するものがある。感染研マニュアルの N2、Roche 社の RdRP は SARS-CoV-2 特異的、Roche 社の N (感染研の N も同一) と E は Sarbecovirus 特異的である。

SARS-CoV が流行していないため、Sarbecovirus の検出により COVID-19 の臨床診断をすることには問題はないため、検査法として適切と考えられるが、検査結果の報告の際には注意が必要である。少なくとも 1 か所について、SARS-CoV-2 特異的領域を選択した場合、SARS-CoV-2 の検出結果としての報告が可能であるが、いずれも非特異的領域である場合は、SARS-like CoV として報告する。

6. 検査値の解釈

病初期 (5 日目) までの時期では、咽頭より鼻腔のウイルス量が多いとされているが、その後減少し検出限界未満となることが多い。下気道検体でのデータは不足しているが、肺炎を呈する患者において、上気道のスワブ検体で検査陰性であったが喀痰で陽性となった症例が本邦では複数報告されている。したがって、特に肺炎患者において上気道検体での検査陰性は慎重に解釈する必要がある。疑い症例の診断目的として、2 回まで保険算定も認められている。

その他に、偽陰性が生じる原因として特に検体採取 (フロックスワブや検体の輸送・保存)・RNA 抽出の際の問題点が考えられる。

7. その他

現在、需要の増大によって輸送培地付きスワブ、RNA 抽出キット、増幅試薬が特に手に入りにくい状況が続いている。試薬発注の際は、新型コロナウイルスの臨床検査に使用するため迅速かつ安定供給ができるよう要請し調整を行うことが望ましい。

参考文献

1. CDC. Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Patients with Confirmed Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) or Persons Under Investigation for COVID-19 in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/infection-control/control-recommendations.html> (accessed at 8 Mar 2020)
2. Zou L, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med. 2020 Feb 19. doi: 10.1056/NEJMc2001737.
3. Lewandowski K, et al. Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. J Clin Microbiol. 2019 Dec 23;58(1). pii: e00963-19. doi: 10.1128/JCM.00963-19.
4. Corman VM et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

改訂

2020.3.11 「陰性判定には外部コントロール(EAV Control)が陽性である必要がある。」へ修正。

2020.4.19

5.1.検査原理：1-step と 2-step の説明が逆であったことを修正。

5.4.精度管理：LightMix Modular EAV RNA Extract, Control、VetMAX Xeno Internal Positive Controls が感染研アッセイとマルチプレックス化可能であることを追記。

連絡先

追加・修正等のご提案がありましたら下記までメールいただけますようお願いいたします。
yazblood@kuhp.kyoto-u.ac.jp