

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「新興・再興感染症のリスク評価と危機管理機能の実装のための研究」
分担研究報告書

新興・再興感染症のリスク評価と危機管理機能の実装のための研究に関する研究

研究分担者 長谷川秀樹 国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター

研究要旨

新型コロナウイルスの検出の迅速な方法としてLAMP法が考えられる。本研究において新型コロナウイルス感染症の原因ウイルスであるSARS-CoV-2の遺伝子検出の為にLAMP法の開発とその社会実装の検証を医療機関において機器を設置し臨床検体を用いてその検出性能を評価した。

A. 研究目的

SARS-CoV-2の迅速検出の社会実装の評価を行う事を目的とした。

B. 研究方法

本研究において国内医療機関4施設と共同研究契約を締結し、Loopamp新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キットを製造し各施設に施設には計7キット(336テスト分)、および、簡易抽出キットであるLoopampウイルスRNA抽出試薬5キット(240テスト分)を提供し検証した。

1) Loopamp新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キットの検出評価試験1) 研究対象として問診、臨床診断等にてSARS-CoV-2の感染が疑われる、またはSARS-CoV-2の感染陽性の症状患者を対象として、文書による同意が得られた患者を対象とした。

2) 対象検体種
鼻咽頭拭い液、喀痰、唾液を対象検体とした。

3) 目標症例数
約250検体

4) 被験試薬及び対照検査法
被験試薬 : Loopamp 新型コロナウイルス2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キット (以下、LAMP法)
対照検査法 : 国立感染症研究所が作成した病原体検出マニュアル記載のPCR法 (以下、感染研PCR法)

5) 検体前処理

以下、QIAamp Viral RNA Mini キットをQIAGEN法、LoopampウイルスRNA抽出試薬を簡易抽出法と記す。なお、QIAGEN法にて得られたRNA抽出液は感染研PCR法及びLAMP法、簡易抽出法による抽出液はLAMP法に使用した。

・鼻咽頭/咽頭拭い液：スワブをウイルス輸送培地に懸濁の後、QIAGEN法にてRNAを抽出した。研究対象者よりもう1本スワブが採取された場合には簡易抽出法にてRNA抽出した。

・喀痰検体は、前述の感染研マニュアル記載の方法に従い、10%DTT水溶液あるいはPBSに溶解した後、QIAGEN法にて抽出した。

・唾液検体はQIAGEN法および簡易抽出法にて抽出を実施した。

6) 評価方法

LAMP法の性能評価は、感染研PCR法に対する検出一致率にて評価した。検体種毎に検出結果を2x2表にまとめ、陽性、陰性、全体一致率を算出した。

(倫理面への配慮)

文書による同意が得られた患者を対象とした。

C. 研究結果

1) 共同研究施設および検体収集結果
共同研究契約を締結した国内4施設の名称、研究責任者、倫理審査承認日、契約期間、採取検体種を表1に記す。また、当該施設より得られた検体種ならびに検体数は、鼻咽頭拭い液130検体、喀痰33検体、唾液135検体、計298検であった。

2) QIAGEN法にて抽出したRNA使用時における感染研PCR法とLAMP法との一致性

感染研PCR法とLAMP法との各一致率を以下に記す（括弧内は95%CI）。

・鼻咽頭拭い液

陽性一致率=98.6%（96.5-100.0）、陰性一致率=95.1%（91.4-98.8）、
全体一致率=96.9%（94.0-99.9）

・喀痰

陽性一致率=100.0%、陰性一致率=100.0%、全体一致率=100.0%

・唾液

陽性一致率=94.7%（99.3-92.6）、陰性一致率=95.0%（89.3-97.6）、
全体一致率=94.8%（91.1-98.6）

なお、当検討ではPCRのCt値とLAMPのTt値とのプロットを作成した。この結果、特に鼻咽頭拭い液と唾液検体にて検体中のウイルス量が高濃度と推察される検体ではCt値とTt値の間に比較的良好な相関が認められた一方で、Ct>35以上の検体にてLAMP陰性となるケースが観察された。

3) 簡易抽出法の評価

QIAGEN-感染研PCR法と簡易抽出-LAMP法との各一致率を以下に記す（括弧内は95%CI）。

・鼻咽頭拭い液

陽性一致率=88.0%（79.2-96.8）、陰性一致率=96.3%（91.2-100.0）、
全体一致率=92.6%（85.1-99.6）

・唾液

陽性一致率=75.7%（68.4-83.0）、陰性一致率=94.9%（91.2-98.6）、
全体一致率=82.7%（78.0-90.4）

D. 考察

1) QIAGEN法使用時の感染研PCR法とLAMP法との一貫性

感染研PCR法とLAMP法の全体一致率は、検体種によらず全て90%以上を示し、両法は同等の検出性能を有するものと示唆された。一方で、両法の判定結果に乖離が生じた検体は全11検体認められたが、総検体の3.7%とごく少数であり、新型コロナウイルスの遺伝子検査に大きな影響を及ぼす数字ではないと推察された。

結果が乖離した検体のうち、PCR陽性/LAMP陰性となった4検体は全てCt>35の値を示した。感染研PCR法では5copies/testでのCt値が36程度となるため、このような検体は極めてウイルス量の低い検体とみなすことができた。また、PCR陰性/LAMP陽性となった7検体は概ねTt>20分を示した。発売当初、LAMP試薬は不適な操作による非特異反応発生が問題となっていたが、当試験に参加頂いた施設には事前に技術移行を十分に行ったため、これらの結果は非特異反応ではなく、PCR陽性/LAMP陰性検体と同様、ウイルス量の少ない検体によるものと考えられた。従って、前述の判定不一致は、両試薬の検出感度付近となるような低ウイルス量の検体により生じた結果のばらつきと推察された。なお、鼻咽頭拭い液1検体にて、QIAGEN抽出液をLAMP法で比較

的早い増幅時間（Tt≒15分）を示したにもかかわらずPCR陰性となった検体が認められた。当検体については阻害成分によるPCR陰性化を視野に更なる検討を行う予定である。

2) 簡易抽出法の評価

鼻咽頭拭い液使用時における簡易抽出-LAMP法と、QIAGEN-PCR法との全体一致率は90%以上を示し、両法は同等の検査性能を有するものと示唆された。PCR陽性/LAMP陰性となった3検体のCt値は27.3、31.3、35.7を示した為、ウイルス量が比較的少ない検体であったものと推察された。

一方で、唾液使用時の簡易抽出-LAMP法では、QIAGEN-PCR法との全体一致率は計算上90%を少し下回る結果となった。しかしながら、信頼区間の上限は90%を超えていることから、大きな不一致とは考えられず、今後症例数を増やして評価を継続する予定である。なお、簡易前処理法-LAMP法の感度が低めに観察された理由は、参照として用いているPCRの検体感度に由来していると考えられる。すなわち、鼻咽頭拭い液の場合、検体採取したスワブをウイルス輸送培地（3mL）に懸濁液してQiagen-PCRを行うが、唾液検体はそのままQiagenに供することが可能である。このため、標準法として用いているPCR法の検体持ち込み量が唾液とスワブで大きく異なっていることになる。一方、簡易抽出法-LAMPでは、スワブであれ唾液であれいずれも同じ簡易前処理試薬（4mL）にほぼ同量懸濁して使用することから検体持ち込み量はどちらも同等である。したがって、あくまでPCRとの比較の上ではわずかに感度が低く観察されているが、簡易で迅速に結果を提供するための手段として目的に応じた使い方をすることで、この簡易抽出法-LAMPを社会実装する意義は大きいと考えられる。

3) 各検査法の操作性について

QIAGEN法は操作が煩雑で1検体あたり30分程度の処理時間を要するのに対し、簡易抽出法ではスワブあるいは唾液を懸濁するだけで処理が完了となる。また、PCR法はキットによっては試薬調製操作が必要な場合もある一方、LAMP法は乾燥試薬をプライマーミックスおよびRNA抽出液で溶解するだけで反応に供することが可能な為、検査時間の短縮、検査技師の負担軽減につながり、結果的に検査数を増加させることに寄与できると考えられる。

E. 結論

・QIAGEN法使用時における感染研PCR法とLAMP法、また、鼻咽頭拭い液を使用した場合のQIAGEN-PCR法と簡易抽出-LAMP法の全体一致率はいずれも90%以上を示し、同等の検出性能を有するものと評価された。

・唾液検体を使用した場合におけるQIAGEN-感染研PCR法と、簡易抽出-LAMP法との全体一致率は90%を少し下回る結果となったが、95%信頼区間の上限は90%を超えており、大きな不一致ではないと考えられた。一方で、簡易抽出-LAMP法は簡易かつ最も短時間での検査が可能であり、検査時間の短

縮、検査技師の負担軽減につながることから、社会実装する意義は大きいと考えられた。

G. 研究発表
1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし