

新型コロナウイルス感染症パンデミック時の緊急行政対応 —核酸増幅検査薬の性能評価とmRNAワクチンの品質評価—

遺伝子医薬部

井上貴雄, 築茂由則, 山本武範, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子

Emergency Administrative Evaluation For the COVID-19 Pandemic: Performance Assessment of Nucleic Acid Amplification Test Kits and Quality Assessment of mRNA Vaccines

Division of Molecular Target and Gene Therapy Products

Takao Inoue, Yoshinori Tsukumo, Takenori Yamamoto, Tokuyuki Yoshida, Nobumichi Ohoka, Eriko Uchida

At the beginning of 2020, when the COVID-19 pandemic emerged, nucleic acid amplification test (NAT) kits to detect SARS-CoV-2 infection were urgently developed. Given the critical importance at the time of quickly identifying infected individuals to prevent the spread of the virus, it was necessary to authorize the use of NAT kits as rapidly as possible. As a result, within roughly six months of the pandemic's onset, dozens of NAT kits for COVID-19 diagnosis were permitted for use.

However, since sufficient performance evaluations of these diagnostic NAT kits had not been conducted in advance, the National Institute of Health Sciences (NIHS) carried out a simultaneous performance evaluation test using a common viral sample. Meanwhile, the development of vaccines to prevent the onset and severity of COVID-19 progressed rapidly, and in February 2021, the mRNA vaccine developed by Pfizer was granted special approval in Japan. Because the Pfizer mRNA vaccine had to be transported in a thawed state, there were significant concerns that vibrations during transportation could affect the quality of the vaccine. Therefore, the NIHS conducted road transport tests of the mRNA vaccine and evaluated the impact of transportation on the RNA strand length contained in the vaccine and on the expression of proteins when added to human cultured cells. This article outlines the background and results of these two emergency administrative responses during the COVID-19 pandemic.

Keywords: COVID-19, nucleic acid amplification test, performance assessment, mRNA vaccine, quality assessment

1. はじめに

2020年初頭に新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) パンデミックが発生した際、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染の有無を判定する核酸増幅検査薬 (Nucleic Acid Amplification Test: NAT検査薬) が緊急開発された。当時は感染者を迅速に特定し感染拡大を食い止めることが極めて重要であったことから、NAT検査薬の使用を可能な限り早く認める必要があった。このことから、COVID-19パンデミック発生から約半年の間に、数十種類のCOVID-19診断用NAT検査薬が使用許可を得るに至った。これらのCOVID-19診断用NAT検査薬

については、事前に十分な性能評価が行われたとは言い難い状況であったため、国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）では、共通のウイルス試料を用いてCOVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験を実施した。

一方、COVID-19の発症及び重症化を予防するワクチンの開発も急ピッチで進められ、2021年2月にファイザー社が開発したCOVID-19予防mRNAワクチンが、国内において特例承認された。ファイザー社のmRNAワクチンについては、解凍した状態で輸送する必要が生じたため、輸送による振動がmRNAワクチンの品質に影響を及ぼすことが強く懸念された。このため、国立衛研

ではmRNAワクチンの路上輸送を実施し、mRNAワクチンに含まれるRNAの鎖長ならびにヒト培養細胞に添加した際のタンパク質発現に対する影響を評価した。本稿では、以上に示したCOVID-19パンデミック時の2つの緊急行政対応について、その背景と成果の概要を紹介する。

2. COVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験

2.1 背景

一般に、ウイルス感染症NAT検査薬の「体外診断用医薬品（以下、体外診断薬）」としての承認審査では、当該検査薬の「対象核酸を正しく検出する能力（分析性能）」と「感染者を正しく特定する能力（臨床性能）」の妥当性を示すため、複数の試験データの提示が求められる¹⁻³⁾。分析性能の評価については、既知濃度の対象ウイルス核酸配列を含む試料を用いた試験が実施される。具体的には、対象ウイルスの検出能力を評価する感度試験、同一の試料を複数回検査した際の再現性を評価する同時再現性試験、一定期間保存した後の性能を評価する安定性試験、反応系に混入しうる物質が検査結果に与える影響を評価する妨害物質試験などの試験がある。臨床性能の評価については、陽性及び陰性の臨床検体を実際に用いて検査を行い、それぞれを「陽性」と「陰性」と正しく判定する能力を評価する。具体的には、先行して承認されたNAT検査薬が存在しない、新規のNAT検査薬の場合は、原則として2施設以上、150検体以上の臨床検体を用い、「感染の有無を判断する基準として用いられている従来の評価法（臨床症状、顕微鏡画像、ウイルス培養、抗原抗体反応などの評価法）に基づく陽性／陰性の結果」と「当該NAT検査薬を用いた検査により得られた陽性／陰性の結果」を比較したデータを提示することが求められる。一方、既承認のNAT検査薬が存在する場合は、既承認品目と陽性／陰性の判定結果がどの程度一致するかを示すことで臨床性能試験とみなすのが一般的である。以上に示した種々の分析性能評価及び臨床性能評価のデータに基づき、体外診断薬としての承認の可否が判断される¹⁻³⁾。

これに対し、COVID-19パンデミック初期のCOVID-19診断用NAT検査薬については、可能な限り早く使用可能にする必要があったため、通常の試験・審査手順とは異なる特例措置により使用の可否が判断された。具体的には、国立感染症研究所（感染研）が発行した病原体検出マニュアルに基づいて簡易的に臨床性能が評価され⁴⁻⁶⁾、合計25の臨床検体（陽性10検体、陰性15検体）を用いた検査結果が、「陽性検体を陽性と判定する割合（感度）が90%以上（ $\geq 9/10$ ）」かつ「陰性検体を陰性と判定する割合（特異度）が100%（=15/15）」の条件を

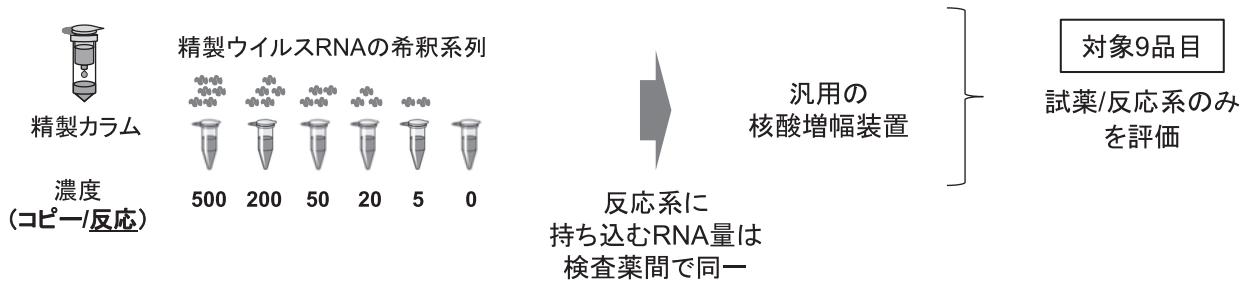
満たした場合に、薬事未承認の「研究用試薬」として使用することが許可された⁵⁻⁷⁾。これらの薬事審査を必要としない研究用試薬については、分析性能に関する詳細な試験計画や結果の提示が不要であるため、多くの研究用試薬は性能の詳細を客観的に確認できない状況であった。研究用試薬としてのNAT検査薬は、厚生労働省健康局結核感染症課及び感染研が発行した「臨床検体を用いた評価結果が取得された2019-nCoV遺伝子検査方法について」に、2020年3月18日から順次掲載され、その後、研究用試薬としての使用許可は2020年9月30日に廃止された⁷⁾。一方、COVID-19パンデミック初期の段階であっても、体外診断薬として正式に承認を受けたCOVID-19診断用NAT検査薬も存在した^{6,8)}。ただ、これらの薬事承認された検査薬についても、承認申請時点では安定性試験が実施されておらず、また、臨床性能試験については、研究用試薬と同様に25の臨床検体（陽性10検体、陰性15検体）のみで評価が実施されていた。このように、薬事承認された検査薬についても、承認時の性能評価データは十分なものではなかった。そのため、適切な臨床性能試験と実保存条件での安定性試験を製造販売後に実施することが承認条件として付記された⁹⁾。

以上のように、COVID-19パンデミック初期に開発されたNAT検査薬については、簡略化された性能評価の結果に基づいて使用許可された経緯があったことから、国立衛研では早期に承認されたCOVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価を実施した。具体的には、まず、2020年5月末時点で使用許可を得ていたNAT検査薬18品目のうち、国立衛研に既に設置されていた汎用の核酸増幅装置（リアルタイムPCR装置：ABI7500）の適用が可能な9品目を評価対象に、「SARS-CoV-2ゲノムRNA（すなわち、裸のRNA）」を共通試料とした一斉性能評価試験を実施した（図1：上段、表1：*を付記した9品目）¹⁰⁾。次に、対象品目を拡大し、2020年7月末時点での使用許可を受けていた全ての検査薬（研究用試薬及び体外診断薬）、ならびに承認申請中であった一部の検査薬、合計30品目を対象に、「SARS-CoV-2ゲノムRNAを内包した模擬ウイルス（すなわち、ウイルス粒子に含まれたRNA）」を共通試料とした一斉性能評価試験を実施した（図1：下段、表1：No.14を除く30品目）。なお、各社のCOVID-19診断用NAT検査薬は名称が類似しているため、本稿ではそれぞれの検査薬を企業名で表記することとする。

2.2 SARS-CoV-2ゲノムRNAを用いたCOVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験

一斉性能評価試験に用いる試料としては、国立衛研で調製したSARS-CoV-2の精製ゲノムRNAを採用した。

1) ウイルスRNAを用いた試験



2) 模擬ウイルスを用いた試験

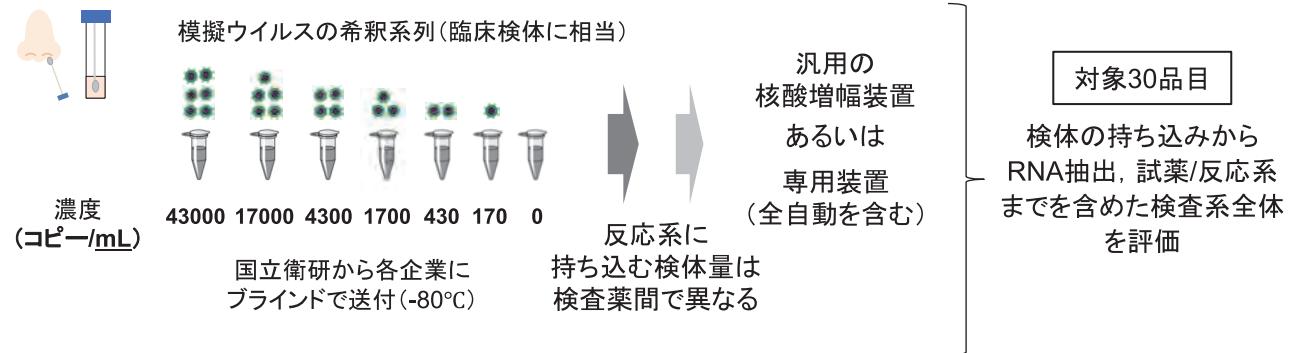


図1 一斉性能評価試験の概要

具体的には、武漢株のSARS-CoV-2を感染させた TMPRSS2 発現 Vero 細胞の培養上清から、全自動核酸抽出装置を用いて精製ウイルスゲノム RNA 溶液を取得し、RNase フリー水を用いて希釈・分注した後、-80℃ に凍結保存した (= 評価用 RNA)。本試験では、各 NAT 検査薬の検出感度を評価するにあたり、評価用 RNA の希釈系列を最終濃度 0 ~ 5.0×10^2 コピー/反応で段階的に調製し、各濃度における陽性判定率 (12 回測定における陽性判定の割合) を各々の検査薬の陽性判定基準に基づいて算出した。その結果、試験対象 9 品目はいずれも、1 反応あたり 5.0×10^1 コピー以上のウイルス RNA を含む試料 (5.0×10^1 コピー/反応以上) を 100% (12/12) の確率で「陽性」と判定した (表 2)。「50 コピー/反応」は、2020 年当時、感染研が「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」¹¹⁾において示した NAT 検査薬が満たすべき性能の参考値であり、この結果から今回対象とした NAT 検査薬は感度の観点から一定の信頼性が確保されていたと考察される。 5.0×10^1 コピー/反応よりも低い濃度を 100% 陽性と判定した検査薬は 5 品目あり (MBL, 島津製作所, タカラバイオ, 富士フイルム和光, プロメガ), そのうち 1 品目は 5.0 コピー/反応でも 100% (12/12) 陽性と判定した (表 2 : 島津製作所)。低濃度試料 (5.0 コピー/反応) の陽性判定率は検査薬ごとに 0 ~ 100% の範囲で大きく異なっており、プライマー配列、ポリメラーゼの種類、核酸増幅時のバッファー組成及び温度条件

件、陽性の判断基準などの違いが陽性判定率の差として現れたと考えられる。

2.3 偽陽性が生じるCOVID-19診断用NAT検査薬の特徴

試験を行った 9 品目のうち 1 品目 (ダナフォーム) について、ウイルス RNA を含まない陰性コントロール (0 コピー/反応) についても、33% の確率 (4/12) で「陽性」と判定した (表 2 : ダナフォーム)。すなわち、反応液中にウイルス RNA が含まれないにもかかわらず、何らかの核酸増幅が起こり、「陽性」と判断されるに至った。当該検査薬は本試験対象の 9 品目の中で唯一、反応原理に等温増幅法を用いており、一般的に用いられるリアルタイム PCR 法とは反応条件等が異なる。以下に、本 NAT 検査薬に関する試験の条件と得られた結果を具体的に記載する。

核酸増幅反応については、使用説明書の記載に従い、核酸増幅装置 (ABI7500) を「反応温度: 等温 (67°C), 蛍光検出: 1 分毎」に設定し、45 分まで経時的に測定した。試験については、各濃度の RNA 試料を $N = 4$ で 3 名が独立して実施した。この結果、各実施者の 4 回の検査のうち、実施者 A で 1 回、実施者 B で 2 回、実施者 C で 1 回、ウイルス RNA を含まない陰性コントロールが陽性判定基準 (40 分以内) よりも早く増幅閾値を超える現象が観察された (図 2 : 黒線)。このことから、当該検

表1 試験対象NAT検査薬の仕様

No.	開発企業 (五十音順)	*1 製品名	*1 分類	*2 保険 適用	*2 薬事 承認	核酸増幅 装置	増幅 原理	増幅 領域	検出 箇所数	増幅 及び 検出
1	アークレイ	i-density Pack UNIVERSAL SARS-CoV-2 キット	研究用 試薬	6月 25日	9月 8日	専用装置	PCR	N	1	—
2	栄研化学	Loopamp 新型コロナウイルス2019(SARS-CoV-2)検出試薬キット	体外 診断薬	3月 18日	3月 31日	専用装置	等温増幅	ORF1ab(RdRp), N	2	*3同一の ウェル
* 3	MBL (医学生物学研究所)	MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット	体外 診断薬	3月 23日	5月 21日	汎用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
4	キヤノン メディカルシステムズ	新型コロナウイルス RNA 検出試薬 Genelyzer KIT	研究用 試薬	3月 26日	-	専用装置	等温増幅	非開示	1	—
5	キヤノン メディカルシステムズ	新型コロナウイルス RNA 検出試薬 LAMPdirect Genelyzer KIT	研究用 試薬	3月 26日	-	専用装置	等温増幅	非開示	1	—
6	杏林製薬	SARS-CoV-2 GeneSOC ER 杏林	研究用 試薬	3月 18日	-	専用装置	PCR	ORF1ab, E	2	異なる ウェル
* 7	システムズ	2019-nCoV検出蛍光リアルタイムRT-PCR キット	体外 診断薬	3月 18日	3月 27日	汎用装置	PCR	ORF1ab	1	—
* 8	島津製作所	2019 新型コロナウイルス検出試薬キット (Ampdirect 2019-nCoV 検出キット)	研究用 試薬	4月 9日	9月 8日	汎用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
9	スティックス バイオテック	新型コロナウイルス検出キット SUDx-SARS-CoV-2 detection kit	研究用 試薬	6月 11日	-	汎用装置	PCR	N	2	異なる ウェル
* 10	タカラバイオ	SARS-CoV-2 Direct Detection RT- qPCR Kit	研究用 試薬	4月 30日	-	汎用装置	PCR	N	*3 2	*3同一の ウェル
11	タカラバイオ	SARS-CoV-2 Direct Detection RT- qPCR Kit ver.2	申請中	10月 27日	10月 27日	汎用装置	PCR	N	*3 2	*3同一の ウェル
* 12	ダナフォーム	SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬	研究用 試薬	3月 18日	8月 17日	汎用装置	等温増幅	ORF1ab	1	—
13	東ソー	2019新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady SARS-CoV-2	体外 診断薬	7月 31日	7月 31日	全自動 専用装置	等温増幅	N	1	—
* 14	東洋紡	新型コロナウイルス検出キット SARS-CoV-2 Detection Kit (N1, N2 set)	研究用 試薬	5月 12日	-	汎用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
15	東洋紡	新型コロナウイルス検出キット SARS-CoV-2 Detection Kit-Multi	申請中	8月 18日	令和3年 6月 3日	汎用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
16	東洋紡	ジーンキューブ SARS-CoV-2	体外 診断薬	7月 2日	7月 2日	専用装置	PCR	N	2	異なる ウェル
17	日本ベクトン・ ディッキンソン	BD MAX ExK TNA-3 セット及びBD MAX PCR Cartridges の組み合わせ	研究用 試薬	3月 9日	-	全自動 専用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
18	日本ベクトン・ ディッキンソン	BD マックス SARS-CoV-2	研究用 試薬	6月 25日	-	全自動 専用装置	PCR	N	2	同一の ウェル
19	ビオメリュー・ ジャパン	FilmArray 呼吸器パネル 2,1	体外 診断薬	6月 2日	6月 2日	全自動 専用装置	PCR	S, M	2	異なる ウェル
20	富士フイルム 和光純薬	ミュータスワコー COVID-19	研究用 試薬	5月 1日	令和3年 11月 30日	全自動 専用装置	PCR	ORF1ab, S	2	同一の ウェル
* 21	富士フイルム 和光純薬	SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit	研究用 試薬	5月 1日	-	汎用装置	PCR	N	2	異なる ウェル
22	富士フイルム 和光純薬	SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit ver.2	申請中	10月 23日	-	汎用装置	PCR	N	*3 2	同一の ウェル
23	フレッシュ・ システム・サイエンス	VIASURE SARS-CoV-2 PCR (ORF1ab gene, N gene)	研究用 試薬	6月 12日	-	全自動 専用装置	PCR	ORF1ab, N	2	同一の ウェル
24	フレッシュ・ システム・サイエンス	LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 Kit	申請中	9月 30日	令和4年 10月 6日	全自動 専用装置	PCR	ORF1ab, N	2	同一の ウェル
25	フレッシュ・ システム・サイエンス	エリート MGB SARS-CoV-2 キット	研究用 試薬	7月 8日	令和3年 6月 21日	全自動 専用装置	PCR	ORF1ab(RdRp), ORF8	2	同一の ウェル
* 26	プロメガ	GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System	研究用 試薬	5月 29日	-	汎用装置	PCR	*4 N	*4 2	異なる ウェル
27	ベックマン・ コールター	Xpert Xpress SARS-CoV-2「セフィード」	体外 診断薬	5月 8日	5月 8日	全自動 専用装置	PCR	N, E	2	同一の ウェル
28	ホロジックジャパン	アブティマ SARS-CoV-2	研究用 試薬	6月 11日	8月 18日	全自動 専用装置	等温増幅	ORF1ab	2	同一の ウェル
* 29	ライフテクノロジーズ ジャパン	TaqPath 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)リアルタイム PCR 検出キット	体外 診断薬	4月 1日	4月 20日	汎用装置	PCR	ORF1ab, S, N	3	同一の ウェル
30	ロシュー・ ダイアグノスティックス	LightMixR Modular SARS and Wuhan CoV E-gene, N gene	研究用 試薬	3月 18日	-	専用装置	PCR	N, E	2	異なる ウェル
31	ロシュー・ ダイアグノスティックス	cobas SARS-CoV-2	体外 診断薬	4月 7日	4月 7日	全自動 専用装置	PCR	ORF1ab, E	2	同一の ウェル

*ウイルスRNAを用いた一斉性能評価試験対象品目。このうち、No.14は模擬ウイルスを用いた一斉性能評価試験の実施時期には開発企業により後継品（No.15）への切り替えが行われていたため、模擬ウイルスを用いた試験の対象から除外した。

* 1 2020年7月末時点の製品名または分類。

* 2 各製品が保険適用あるいは薬事承認された月日。年はいずれも2020年（令和2年）。

* 3 検出箇所は2箇所だが、検出プローブが同じ蛍光標識のため、蛍光値の合算で検査結果を判断。

* 4 付属プライマーなし。公表情報と同様に本試験でも感染研（NIID）Nプライマー、N2プライマーで評価。

表2 試験対象9品目の検出性能の評価

開発企業 (五十音順)	陽性判定基準 Ct値	5.0×10 ² コピー	2.0×10 ² コピー	5.0×10 ¹ コピー	2.0×10 ¹ コピー	5.0 コピー	0 コピー
MBL	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	83% (10/12)	0% (0/12)
シスメックス	<38	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	92% (11/12)	67% (8/12)	0% (0/12)
島津製作所	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)
タカラバイオ	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	67% (8/12)	0% (0/12)
ダナフォーム	<40分	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	50% (6/12)	33% (4/12)	33% (4/12)
東洋紡	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	83% (10/12)	75% (9/12)	0% (0/12)
富士フィルム和光	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	92% (11/12)	0% (0/12)
プロメガ	<40	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	67% (8/12)	0% (0/12)
ライフテクノロジーズ	<37	100% (12/12)	100% (12/12)	100% (12/12)	83% (10/12)	0% (0/12)	0% (0/12)

100%	83-92%	75%	50-67%	33%	0%
------	--------	-----	--------	-----	----

各濃度の評価用RNA試料 (5.0×10², 2.0×10², 5.0×10¹, 2.0×10¹, 5.0, 0 コピー/反応) を合計N=12で測定した結果のうち、「陽性」と判断された回数の割合

検査については、一定の頻度で陰性コントロールにおいて核酸が増幅・検出される現象（すなわち、偽陽性に相当する現象）が発生すると判断し、本結果を直ちに厚生労働省ならびにダナフォーム社に報告した。

ダナフォーム社では、国立衛研からの指摘を受け、本試験で使用した核酸増幅装置及び測定プレートの組み合わせ (ABI7500及びMicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate) を含めた合計27の組み合わせについて、追加検証が実施された。この結果、一斉性能評価試験に使用した核酸増幅装置及びプレートの組み合わせを用いた場合、376回の測定のうち、47回で偽陽性が発生することが確認された（すなわち、国立衛研で特定した偽陽性が開発企業において再現された）¹⁰⁾。また、これ以外の8つの組み合わせについても同様に偽陽性が生じることが判明した。一方、残り18の核酸増幅装置及びプレートの組み合わせ (CFX96 Touch及びMultiplate PCRプレートなど) では、偽陽性が観察されなかった^{20, 21)}。すなわち、偽陽性が生じる核酸増幅装置とプレートの組み合わせと生じない組み合わせがあることが明らかになった。これらの結果を踏まえ、ダナフォーム社は当該NAT検

査薬 (SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬) の使用にあたり、当初適用可能としていた核酸増幅装置とプレートの情報を改め、偽陽性の発生が懸念されるすべての組み合わせを適用不可とした。ダナフォーム社が最終的に適用可能と判断した組み合わせについては、「SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬リアルタイム PCR 装置、消耗品一覧」¹²⁾に記載されている。

以上に示したように、COVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験により偽陽性が生じるNAT検査薬を特定することに成功し、開発企業に迅速な対応を促したことで、検査機関における偽陽性判定の拡大防止に貢献した。非感染者を「感染者」と診断してしまう偽陽性判定は、国民に対し本来不要である苦痛を強いるだけでなく、誤って「濃厚接触者」と認定される者にも不安を与えるなど、家族や所属組織を含む周辺環境に与える影響も甚大である。したがって、本試験の成果が公衆衛生保全に果たした役割は極めて大きい。

なお、当該NAT検査薬で偽陽性が生じる原因については、当該製品に特有の核酸増幅機構ならびに増幅核酸検出機構に起因すると考えられるが、特定の製品の原因

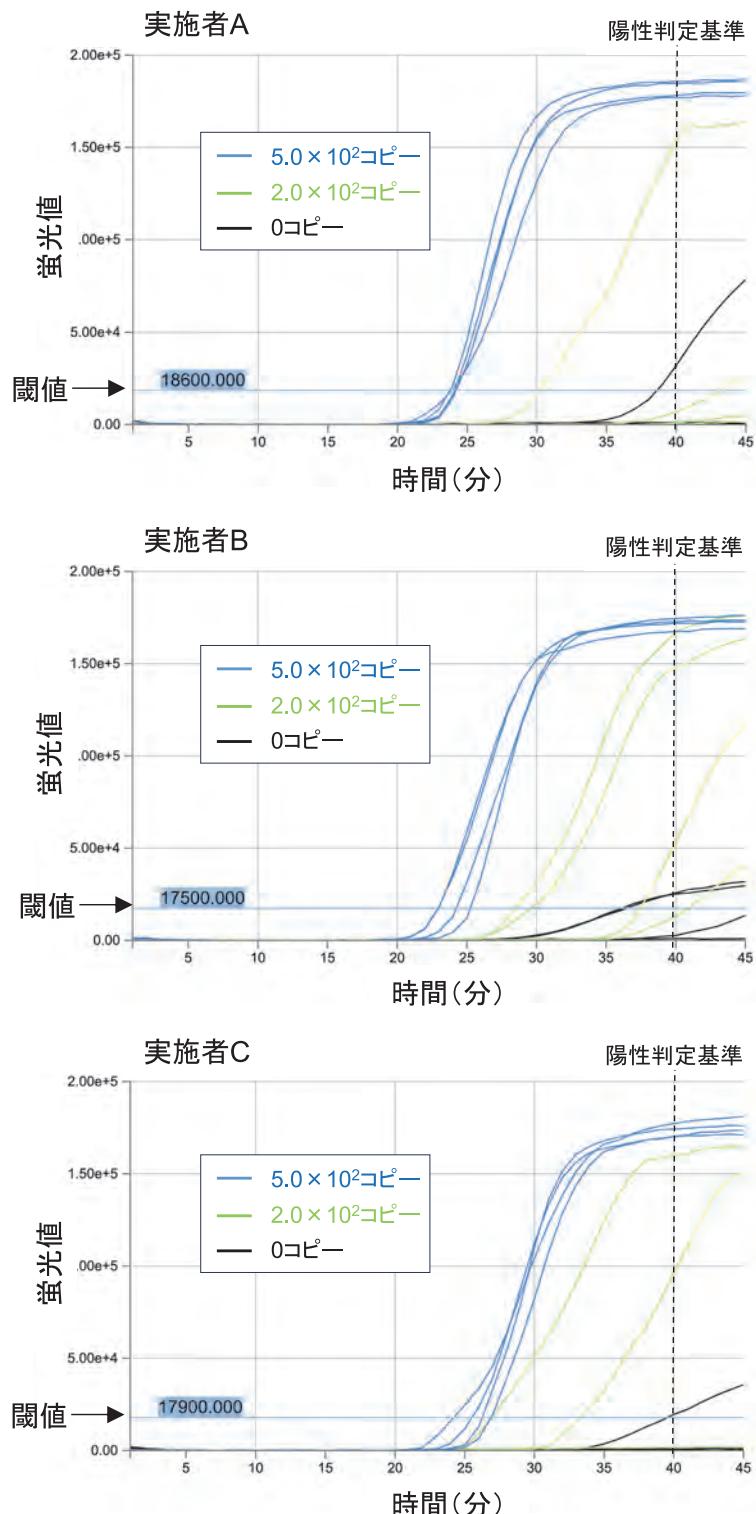


図2 偽陽性が生じるNAT検査薬の特定

3名の実施者 (A, B, C) による検討結果: 0 コピー/反応 (黒), 2.0×10^1 コピー/反応 (緑), 5.0×10^2 コピー/反応 (青)

究明や解釈には開発企業で実施されるべきであり、国立衛研が推測で論じるべきではないと考える。このことから本稿では、偽陽性が生じる原因や当該企業の対応の妥当性等について考察しない。

2.4 模擬ウイルスを用いたCOVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験

上述の一斉性能評価試験では、NAT検査薬の検出感度を評価するため、精製したSARS-CoV-2のゲノムRNAを共通試料として用い、1反応あたりのウイルス

RNAのコピー数を $5.0 \sim 5.0 \times 10^2$ コピー/反応に統一して検査を行い、「陽性」と判断できるか否かを評価した。この試験では、精製したウイルスRNAを反応系に直接持ち込んでいるため、「RNAからDNAへの逆転写反応と、それに続く核酸增幅反応の性能（=検査薬に含まれる酵素の性能）」を評価していることになる（図1：上段）。したがって、上述の性能評価試験においては、各検査薬で最終的に反応系に持ち込まれる臨床検体の量が異なる点については考慮されておらず、また、前処理として実施されるRNAの抽出や精製などの工程に関連する性能が評価されていない。また、本試験では国立衛研に設置された汎用の核酸增幅装置で評価可能な9品目のみしか検証していないという課題がある。

以上を踏まえ、我々はさらに、2020年7月末時点で使用許可を受けていた全ての検査薬（研究用試薬及び体外診断薬）、ならびに承認申請中であった一部の検査薬、合計30品目を対象とした一斉性能評価試験を実施することとした（図1：下段）。これらのNAT検査薬の中には、臨床検体（鼻ぬぐい液がウイルス輸送液に懸濁された検体など）を数百μL、直接専用の機器に投入するような検査薬も含まれていることから（すなわち、専用機器の中での処理工程にウイルス粒子からRNAを抽出・精製する過程が含まれることから）、精製したウイルスRNAではなく、ウイルスそのものを試験に用いる必要があった。また、すべての専用機器を国立衛研に揃えることは困難であったため、各社が所有する機器を用いて各社で性能試験を実施する必要があった。このことから、感染リスクのあるSARS-CoV-2そのものではなく、感染リスクの無いSARS-CoV-2の模擬ウイルスを評価試料として用いることとした。本試験に用いた模擬ウイルス（AccuPlex SARS-CoV-2 full genome）は、SARS-CoV-2と構造が類似したアルファウイルスを利用したものである。具体的には、SARS-CoV-2ゲノムRNA全長を複数に分割したRNA断片（4 kb程度）をそれぞれゲノムに組み込んだアルファウイルス粒子が等量（ 1.00×10^6 コピー/mL）ずつ混合されている。本試験においては、模擬ウイルス原液（ 1.00×10^6 コピー/mL）をウイルス輸送液で希釈した試料（ 4.29×10^4 , 1.71×10^4 , 4.29×10^3 , 1.71×10^3 , 4.29×10^2 , 1.71×10^2 , 0 コピー/mLの7種）を国立衛研で調製し、濃度非開示で各企業に送付した。模擬ウイルス濃度のうち、「 4.29×10^3 コピー/mL」は、2020年当時、感染研が「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver. 2.9.1」¹¹⁾において示していた感染研法（=QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いて抽出したRNA溶液5 μLを1反応に使用）を用いた場合、「50コピー/反応」に相当する濃度であり、これを基準に高濃度側及び低濃度側に希釈系列を作製した。本試験で用いた模擬ウ

イルス溶液は陽性臨床検体に相当するものであり、本試験により検体の持ち込み量、RNAの抽出・精製過程、試薬の酵素反応までを含めた検査系全体の性能を評価することが可能である（図1：下段）。

各参加企業において、各濃度の模擬ウイルス溶液を合計6回検査した結果、30品目中28品目については、感染研法で50コピー/反応に相当するウイルス濃度（ 4.29×10^3 コピー/mL）の検体を100%（6/6）の確率で「陽性」と判定した。このことから、これらのNAT検査薬については、検出感度の観点では大きな問題はないことが確認された。なお、残りの2品目については、技術的な観点から本試験で用いた「模擬ウイルス溶液を試料とする検査」については適用が難しいことが判明した（すなわち、NAT検査薬そのものに問題があるわけではない）。

2.5 本一斉性能評価試験の結果の解釈の留意点

本一斉性能評価試験では、SARS-CoV-2ゲノムRNAならびに模擬ウイルス溶液を共通試料として用い、実際の検査で行われる方法・手順と同一の条件でCOVID-19診断用NAT検査薬の評価を行った。その結果を解釈する際の留意点としては、本試験では臨床検体を用いていないため、臨床検体に本来含まれる宿主核酸や粘性成分等の夾雑物の影響が評価できていない点が挙げられる。また、臨床検体では、SARS-CoV-2ゲノムRNAの3'末端側の遺伝子領域のRNAの転写量が多いが¹³⁾、本試験で用いた模擬ウイルスではゲノム全長に渡ってRNA量が均一であるため、臨床検体における転写RNA量の不均一性は評価結果に反映されていない。すなわち、臨床検体を用いた場合には、ゲノムRNAの3'末端側にプライマーを設定した検査薬の方が、陽性判定率が相対的に高くなると考えられるが、この点は評価できていない。

評価項目の観点では、本研究ではNAT検査薬の陽性判定率（検出感度）の観点から評価を行ったが、各NAT検査薬には検出感度以外にも、汎用性、簡便性、迅速性、スループット、コスト等の観点から、それぞれ優位性を有するケースがあり、検査現場の状況に応じて、それが重要な利点となり得る。したがって、今回の試験で示した検出感度のみで検査薬の優劣が判断されるわけではない点について注意が必要である。各NAT検査薬の適切性については、検出感度に加え、このような使用される場面等に応じた優位性についても考慮しながら、総合的に判断する必要があろう。

3. COVID-19予防mRNAワクチンの輸送の影響に関する検証

3.1 背景

COVID-19予防ワクチンの開発においては、mRNAワ

クチンがダークホースのごとく頭角を現し、その驚異的な開発スピードと圧倒的な予防効果で大きな注目を集めた。国内でもファイザー社とモデルナ社のmRNAワクチンが広く接種され、その存在は一般にも広く認知されることとなった。このmRNAワクチンの成功により、「mRNA」が医薬品モダリティとして有用であることが実証され、その研究開発が一気に加速した。2025年4月現在、日米欧のいずれかで既承認のmRNA医薬としては、COVID-19予防mRNAワクチン4品目（ファイザー、モデルナ、第一三共、Meiji Seikaファルマ）ならびに呼吸器合胞体（RS）ウイルスmRNAワクチン1品目（モデルナ）の合計5品目がある。臨床試験段階にあるmRNA医薬候補品は少なくとも160にのぼり、その内訳は、感染症予防mRNAワクチン118品目、がん治療mRNAワクチン21品目、疾患治療mRNA医薬（非ワクチン）26品目である。さらに、Cas9などのゲノム編集酵素をコードするmRNAを搭載した*in vivo*ゲノム編集製品（mRNA/sgRNA-LNP製剤）についても11品目が臨床試験段階にある。

以上のように現在では、mRNA医薬の臨床開発は大きく進展しており、mRNA医薬の品質特性やそれに対応する生物学的応答についても一定の理解が得られつつある。しかしながら、2021年2月にファイザー社のCOVID-19予防mRNAワクチンが国内において特例承認された当時は、mRNAワクチンに関する知見はほとんど存在しない状況であった。当時、mRNAワクチンは非常に不安定で壊れやすいものと考えられており、流通あるいは接種の現場において、その取り扱いに不安の声が挙がっていた。特に、超低温（-90°C～-60°C）で保管する必要のあるファイザー社のmRNAワクチン（コミナティ）については、物流や輸送資材等の観点から、解凍した状態で輸送せざるを得ない状況が生じ、揺れや振動の影響が強く懸念された。これに対し、厚生労働省はバイクや自転車による輸送を避けるなどの対応を行ったが、mRNAワクチンの輸送時の安定性に関する知見に乏しく、車両を用いた路上輸送の妥当性について説明が1できない状況であった。

この背景の下、国立衛研は厚生労働省より、「解凍状態での路上輸送がmRNAワクチンの品質に与える影響」について解析の依頼を受け、直ちに輸送試験の実施に向けた準備に着手した^{14, 15)}。当時（2021年2月）はコミナティの入手が極めて困難であり、ファイザー社との交渉により、日本に最初に導入されたコミナティ（2021年2月12日：成田空港到着）のうち、20本のバイアルがドライアイス詰めで国立衛研に供与された（すなわち、予備検討を含め、解析できるN数は最大で20であった）。また、当時はmRNA含有脂質ナノ粒子製剤の分析法に関

する知見が存在しなかったことから、国立衛研において評価手法を一から構築する必要があった。このように、種々の制限のかかった手探りの状況の中、緊急に検証する必要があったことを最初に強調する。

3.2 mRNAワクチンの構造と性質

一般的なmRNAワクチンの模式図を図3に示す。mRNAワクチンは数千塩基長のRNA鎖と4つの脂質成分〔pH感受性脂質、PEG（ポリエチレングリコール）修飾脂質、リン脂質コレステロール〕で構成されるmRNA含有脂質ナノ粒子製剤である。製造法としては、ポリアニオンであるmRNAを含む水溶液と上記の4つの脂質が溶解したエタノール溶液を流路内で混合し、水の割合を急激に高めることで疎水性である脂質成分の会合を促し、mRNAを包含した脂質ナノ粒子を形成させる。脂質ナノ粒子はリポソームの一種であるが、古くから知られる狭義のリポソームは一般的には脂質二重膜で構成され、内部が空洞である。一方、上記の製造法で作製したmRNA含有脂質ナノ粒子は核酸成分と脂質成分が相互作用し、中身まで詰まった構造をとる。複数の脂質成分が疎水性相互作用により会合した構造体を考えると、mRNAワクチンが輸送による振動の影響を受ける可能性があると考えられた。

脂質成分に加え、mRNA自体も不安定であることは特に生化学/生物学の研究領域では広く知られている。mRNAワクチンの製造過程でRNA分解酵素（リボヌクレアーゼ）が混入することは考えにくいが、RNA鎖はDNA鎖と異なり、核酸糖部の2'位の水酸基がリン酸ジエステル結合に対して求核反応を引き起こすため、化学構造として分解されやすい性質を有する（図3）。一般に化学反応は温度の上昇と共に進行しやすくなるため、科学的根拠が提示されない状況においては、超低温で保管する必要のあるコミナティを解凍した状態（すなわち0°C以上）で輸送した際に分解される可能性も考えられた。

以上のような懸念が当初念頭にあったため、本輸送検証にあたっては、「輸送が品質に影響を与える可能性が十分にあるのではないか」、「輸送により品質が低下することが実証された場合、ワクチン接種ができなくなるのではないか」という不安と緊張感を抱いての試験実施となった。

3.3 mRNAワクチンの輸送の影響に関する検証

当時、超低温の条件下で海外から空輸されたコミナティは、超低温冷凍庫を備えた基本型接種施設にドライアイス詰めの保冷容器で移送された。その後の各接種施設への輸送については、通常、「保冷バッグを用いて、

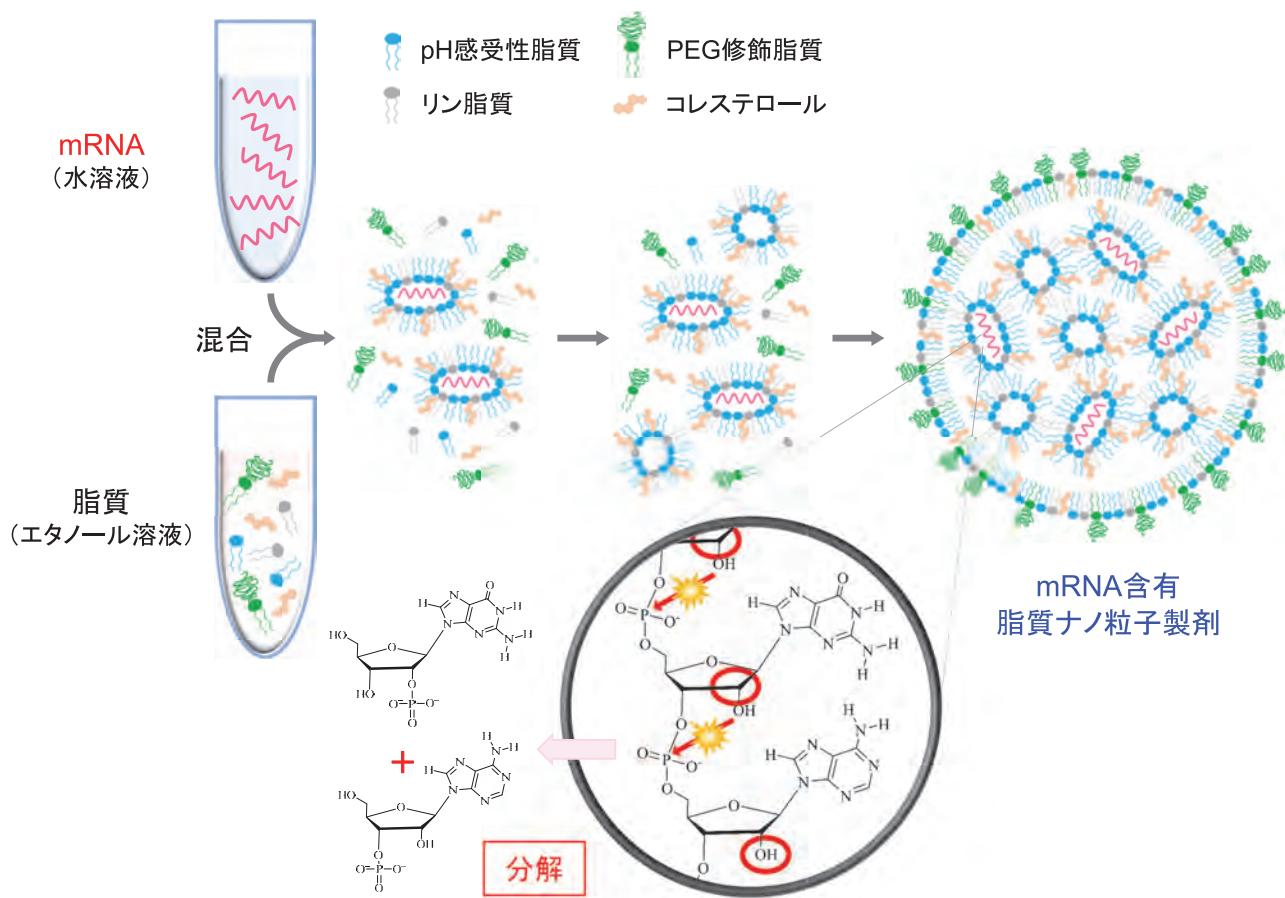


図3 mRNAワクチン (mRNA含有脂質ナノ粒子製剤) の製造法と構造

2°C～8°Cで3時間以内に輸送すること」と規定された¹⁶⁾。これを踏まえ、本試験では輸送時間として3時間を設定し、さらに、3時間では輸送が完了しないケースを想定し、6時間の条件も設定した。保冷バッグについては、厚生労働省がコミナティの輸送にために特注した「スギヤマゲン2～8°C定温輸送容器セットB3」を用いた(図4A)。保冷バック(発泡スチロールの箱)の中は、アルミ内箱、バイアルホルダー、保冷剤(4枚)から構成されており、35°Cの環境下でも8°C以下を12時間保持できるとされている(図4B)。バイアルホルダーはコミナティのバイアルに密着する大きさとなっているため、ホルダーの穴の中でカタカタと振動することはない。輸送試験の際には、アルミ内箱の中と発泡スチロール内に温度変化を記録するための温度ロガーを設置し、実際に規定の2°C～8°Cに厳密に保たれていたことを確認している(図4C)。輸送に用いる車種については、実際にコミナティの輸送に使用されるものと同等の車両を使用した(図4D)。走行ルートとしては、国立衛研(川崎市川崎区殿町)を起点として横浜方面の一般道を走行し、時間調整のため国立衛研近くの高速道路も一部走行した。

解凍した状態での路上輸送がコミナティの品質に与え

る影響を検証するために、短期間のうちに評価系を構築することができた「①全長mRNA含有率」ならびに「②スパイクタンパク質の発現」の2つの指標について評価を行った。①に関して、コミナティに含まれるRNAを抽出した後、キャピラリーゲル電気泳動により分離し、全長を維持した目的mRNAを含むピークの割合を評価した結果、輸送サンプルとコントロールサンプル間でピークの割合に差は見られなかった。また、目的mRNAよりも鎖長の短いRNA群が不純物として観察されたが、短鎖RNAの鎖長分布についても変化が見られなかった。このことから、解凍状態での今回の輸送条件は、RNAの鎖長分布に影響を与える、全長を保持した目的mRNAの含有割合は維持されていると考えられた。②に関して、コミナティをヒト由来培養細胞に添加し、mRNAがコードするSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の発現量をウェスタンプロットで評価した結果、輸送サンプルについても、コントロールと同等の発現量が観察された。ヒト細胞を用いた発現解析では、「mRNA含有脂質ナノ粒子がヒト培養細胞に取り込まれ、細胞質に到達したmRNAがスパイクタンパク質に翻訳されるまでの一連の過程」を、生物学的指標に基づき評価しているが、スパイクタンパク質の発現量が変化しなかったことか



図4 コミナティの輸送に用いられた保冷バックと輸送試験に用いた車両

ら、mRNAだけでなく脂質ナノ粒子についても、今回の輸送条件では大きな影響は受けないと判断される。国立衛研は、以上の検証結果を直ちに厚生労働省に報告するとともに、国立衛研のホームページを通して広く国民に発信をした。本成果は、厚生労働省を介して政府関係者にも迅速に周知され、当初計画されたワクチン輸送の妥当性を示す重要な科学的根拠となった。

国立衛研ではモデルナ社のmRNAワクチン（スパイクバックス）に関しても同等の条件で輸送の影響に関する検証を行っており、コミナティと同様の結果を得ている¹⁷⁾。前述したように本輸送試験は、実施した当時の状況において可能な範囲での緊急検証を行ったものであり、臨床における有効性や安全性への影響を考察できるだけの十分な評価を実施したわけではない。しかしながら、コミナティが国内に導入される際に議論された安定性に関する疑念を大きく払拭する成果となり、結果的にワクチン接種の推進・拡大に大きく寄与した。

4. おわりに

以上、COVID-19パンデミック時の2つの緊急行政対

応として、国立衛研・遺伝子医薬部を中心的に実施した「COVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験」ならびに「COVID-19予防mRNAワクチンの輸送の影響に関する検証」について紹介した。

前半に記載した一斉性能評価試験を実施することになった背景には、緊急に開発されたCOVID-19診断用NAT検査薬の性能評価を十分に実施できなかったという問題がある。特に臨床性能評価については、開発当時は感染者が少なく臨床検体の入手が困難であり、また、ウイルスの感染力や危険性が未知であったため、評価実施者の安全性確保に苦慮した経緯がある。これに対し、米国においては、生体試料等のマトリックスに感染性のないウイルスRNA等のスパイク物質を添加した疑似臨床検体が、パンデミック初期に開発されたNAT検査薬の臨床性能評価に積極的に活用されていた。国内では疑似臨床検体を作製・供給する体制自体が存在しないため、次の新興感染症パンデミック発生への備えとして、疑似臨床検体の迅速な供給とこれを用いた性能評価の在り方について、今後議論を深めることが肝要である。国立衛研では現在この点に重点をおき、産官学連携の下、

疑似臨床検体の開発や評価に関する研究を進めている。

後半に記載したmRNAワクチンの輸送検証については、これを契機として、mRNA医薬の品質評価に関する研究に移行し、製薬協・mRNA医薬品質評価タスクフォースならびにmRNA医薬のCMCに関わるCDMO、CRO、分析機器メーカー等と共に評価科学的研究を推進している。現在では、「mRNA医薬のどの品質特性を評価すればよいか」については整理されつつあるが、ひとつの品質特性に対して、複数の評価手法が適用可能なケースが多く、どの場面で、どの評価手法を使うのが妥当であるかについては、開発側も規制側も手探りの状態である。これは、各評価法の分析能力、限界、再現性等を比較・把握するための評価研究が体系的に行われていないことに起因する。これを踏まえ、国立衛研では各評価法を比較するためのモノサシとして、モデルmRNA医薬やモデル不純物などのmRNA関連参照物質を作製し、これを用いて各評価法を比較し、それぞれの特徴ならびに留意点の明確化を行っている。

このような有事の際の緊急対応を教訓したレギュラトリーサイエンス研究は、次なる有事の際の大きな礎になると信じる。その成果を次の世代に確実に生かしてもらえるよう、情報発信と社会実装を意識したい。

謝辞

COVID-19パンデミック時の緊急対応において、終始御指導を頂きました国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広所長ならびに本間正充副所長（当時）に心より感謝申し上げます。COVID-19診断用NAT検査薬の一斉性能評価試験は、厚生労働省新型コロナウイルス感染症に係る体外診断用医薬品の信頼性確保事業（令和2年度第一次補正予算）及び日本医療研究開発機構（課題番号JP21mk0101206）の支援を受けて実施しました。また、COVID-19予防mRNAワクチンの輸送の影響に関する検証は、厚生労働省ワクチン等生物製剤品質安全性確保事業（医薬品承認審査等推進費）及び日本医療研究開発機構（課題番号JP20mk0101187）の支援を受けて実施しました。一斉性能評価試験の実施に御協力を頂きましたアーケレイ、栄研化学、MBL（医学生物学研究所）、キヤノンメディカルシステムズ、杏林製薬、シスメックス、島津製作所、スディックスバイオテック、タカラバイオ、ダナフォーム、東ソー、東洋紡、日本ベクトン・ディッキンソン、ビオメリュー・ジャパン、富士フイルム和光純薬、プレシジョン・システム・サイエンス、プロメガ、ベックマン・コールター、ホロジックジャパン、ライフテクノロジーズジャパン、ロシュ・ダイアグノスティックスの関係者の皆さんに深く御礼申し上げます。最後に、両試験に御協力を頂きましたすべての皆さんに心よ

り御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 体外診断用医薬品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について 薬食機参発1121第16号平成26年11月21日
- 2) 体外診断用医薬品に係る基本要件基準適合性チェックリストについて 薬生機審発0818第2号令和3年8月18日
- 3) 体外診断用医薬品製造販売承認申請用チェックリスト（案）資料1-2-4 別添2 <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2007/08/dl/s0822-5i.pdf>
- 4) 国立感染症研究所. “臨床検体を用いた評価結果が取得された2019-nCoV遺伝子検査方法について”, <https://www.pref.osaka.lg.jp/documents/4156/2019-ncov-17-current.pdf>
- 5) 疑義解釈資料の送付について（その22）厚生労働省 保険局医療課 事務連絡 令和2年3月18日
- 6) 厚生労働省. “新型コロナウイルス感染症の体外診断用医薬品（検査キット）の承認情報”. https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html
- 7) 新型コロナウイルス 病原体検出マニュアルについて 国立感染症研究所ウイルス第3部 白戸憲也 令和2年度 希少感染症診断技術研修会 令和2年12月22日 https://www.niid.jihs.go.jp/images/plan/kisyo/1_shirato.pdf
- 8) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課、厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課 “新型コロナウイルス感染症の発生に伴う当面の医薬品、医療機器、体外診断用医薬品及び再生医療等製品の承認審査に関する取扱いについて”. 令和2年4月13日、事務連絡
- 9) 医学生物学研究所. MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット、添付文書。
- 10) 築茂由則、吉田徳幸、大岡伸通、内田恵理子、鈴木孝昌、米満研三、上間匡、本間正充、合田幸広、井上貴雄. 共通ウイルスゲノムRNAを用いたCOVID-19診断用核酸增幅検査薬の一斉性能評価試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024;55:295-310. doi.org/10.51018/pmdrs.55.4_295
- 11) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 令和2年3月19日 <https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/2019-nCoV20200319.pdf>
- 12) SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬 リアルタイム PCR 装置、消耗品一覧（2023/6/19 現在）<https://drive.google.com/file/d/1tmArEx04evuyNYovGxQVIutp-8cDHC1/view>

- 13) Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 2020, 181(4), p914-921. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011
- 14) 国立医薬品食品衛生研究所. “新型コロナワクチン（ファイザー社）の輸送の影響に関する検証”. 2021年12月20日. <http://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/COVID-19-vaccine-test-03.pdf>
- 15) 井上貴雄, 山本武範, 大岡伸通, 吉田徳幸, 内田恵理子, 新型コロナmRNAワクチンの輸送の影響に関する検証. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 2022;53:219-222. doi.org/10.51018/pmdrs.53.3_219
- 16) 厚生労働省健康局健康課予防接種室. “新型コロナウイルスワクチンの接種体制の構築について”. 2021年1月15日. <https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000721004.pdf>
- 17) 国立医薬品食品衛生研究所. “新型コロナワクチン（モデルナ社）の輸送の影響に関する検証”. 2021年12月6日. <http://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/COVID-19-vaccine-test-02.pdf>