

2021年8月27日 オンライン開催
令和3年度 国立衛研公開シンポジウム
新型コロナと戦う国立衛研のレギュラトリーサイエンス



新型コロナウイルス感染症診断用 核酸検査薬の性能評価

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子医薬部
井上 貴雄

本日の話題

1. COVID-19診断用核酸増幅検査薬の性能評価
2. 緊急開発される核酸増幅検査薬の信頼性確保に向けた取り組み
3. 新型コロナワクチンの輸送の影響に関する検証

緊急で使用許可を受けたCOVID-19診断用核酸増幅検査薬:28品目 (Nucleic acid Amplification Test: NAT検査薬)

企業名(五十音順)	反応原理	RNA抽出から測定までの操作	RNA精製	*反応時間	増幅領域	プライマーセット数
アークレイ	PCR	手動	有	通常	N	1
栄研化学	等温増幅	手動	有, 無	迅速	ORF1ab, N	2
MBL (医学生物学研究所)	PCR	手動	有	通常	N	2
キヤノンメディカルシステムズ	等温増幅	手動	有	迅速	非公開	1
杏林製薬	PCR	手動	有	迅速	ORF1ab, E	2
シスメックス	PCR	手動	有	通常	ORF1ab	1
島津製作所	PCR	手動	無	通常	N	2
タカラバイオ	PCR	手動	無	迅速	N	2
タカラバイオ	PCR	手動	無	迅速	N	2
ダナフォーム	等温増幅	手動	有	迅速	ORF1ab	1
東ソー	等温増幅	全自動	有	迅速	N	1
東洋紡	PCR	手動	有	通常	N	2
東洋紡	PCR	手動	無	通常	N	2
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	通常	N	2
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	通常	N	2
ビオメリュー・ジャパン	PCR	全自動	有	通常	S, M	2
富士フイルム和光純薬	PCR	全自動	有	迅速	ORF1ab, S	2
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	迅速	N	2
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	迅速	N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, ORF8	2
プロメガ	PCR	手動	有	通常	N	2
ベックマン・コールター	PCR	全自動	有	通常	N, E	2
ホロジックジャパン	等温増幅	全自動	有	通常	ORF1ab	2
ライフテクノロジーズジャパン	PCR	手動	有	通常	ORF1ab, S, N	3
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	手動	有	通常	N, E	2
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, E	2

*逆転写・増幅反応時間: 1時間以内(=迅速)、1時間以上(=通常)

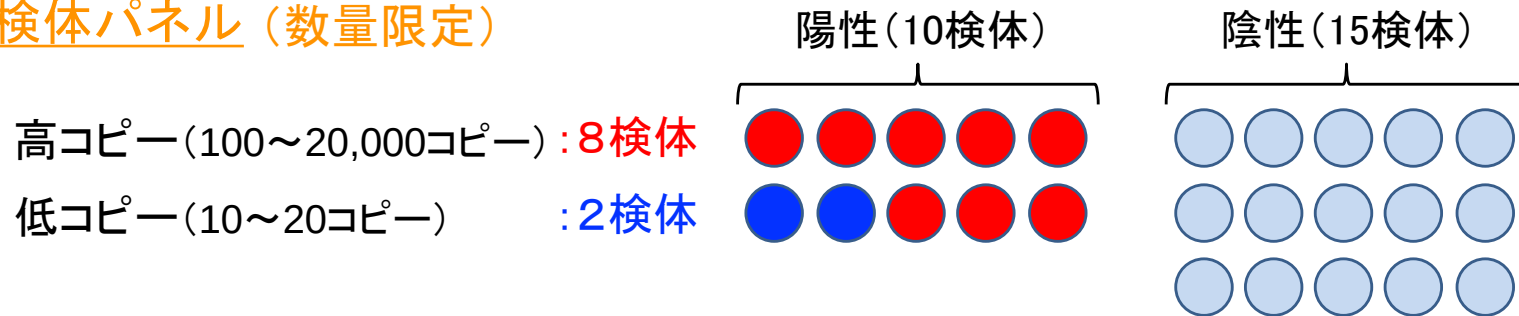
2020年7月末までに国内で使用許可されたNAT検査薬

COVID-19診断用NAT検査薬の緊急開発の経緯

2020年	1月10日	新型コロナウイルスの遺伝子配列が判明
	1月14日	国内初感染者を確認
	1月30日	ウイルスの分離に成功(感染研)
	2月初旬	検査薬会社が開発に着手(厚労省の依頼)
	3月 4日	「臨床検体パネル」配布を開始(感染研)
	3月中旬～	一定の基準を満たすNAT検査薬の使用を許可

COVID-19診断用NAT検査薬の使用許可の基準

臨床検体パネル（数量限定）



使用許可の基準：

- ✓ 陽性検体 9/10以上 を検出（低コピー検体を1つ落としてもよい）
- ✓ 陰性検体 15/15 を不検出



28品目 が使用許可を取得（2020年7月末時点）

体外診断薬
（薬事承認）
9品目

研究用試薬
（薬事未承認）
19品目

- ✓ 評価に用いられた臨床検体の数が限定的
- ✓ 同一の臨床検体で評価されていない検査薬が多く含まれる

概要

国内で用いられているCOVID-19診断用NAT検査薬の信頼性を確認する目的で,

コピー数を規定した同一の試料(ウイルスRNA or 模擬ウイルス)

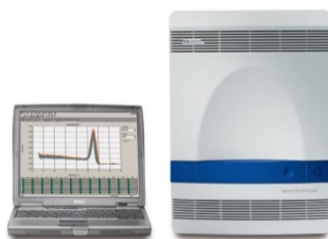
を用いて, 一斉試験を実施.

- 1) 「ウイルスRNA」を用いたNAT検査薬の一斉試験
- 2) 「模擬ウイルス」を用いたNAT検査薬の一斉試験

一斉試験に供する核酸増幅検査薬の選定基準

1) ウイルスRNAを用いた試験
(9品目: 国立衛研で実施)

汎用測定装置

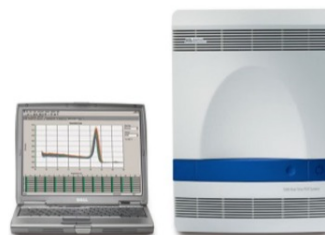


9キット

2020年3月～5月
に使用許可

2) 模擬ウイルスを用いた試験
(28品目: 各企業で実施)

汎用測定装置



13キット

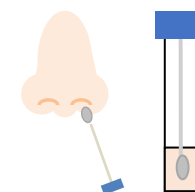
2020年3月～7月
に使用許可

専用測定装置(全自動含む)



15キット

臨床検体
数百 μ Lを
直接投入

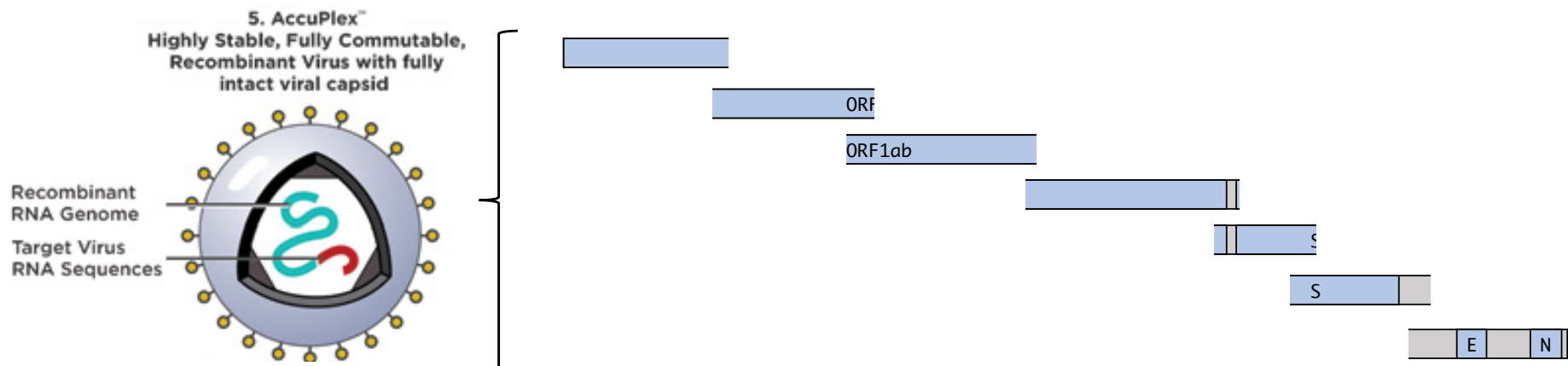


緊急で使用許可を受けたCOVID-19診断用NAT検査薬:28品目

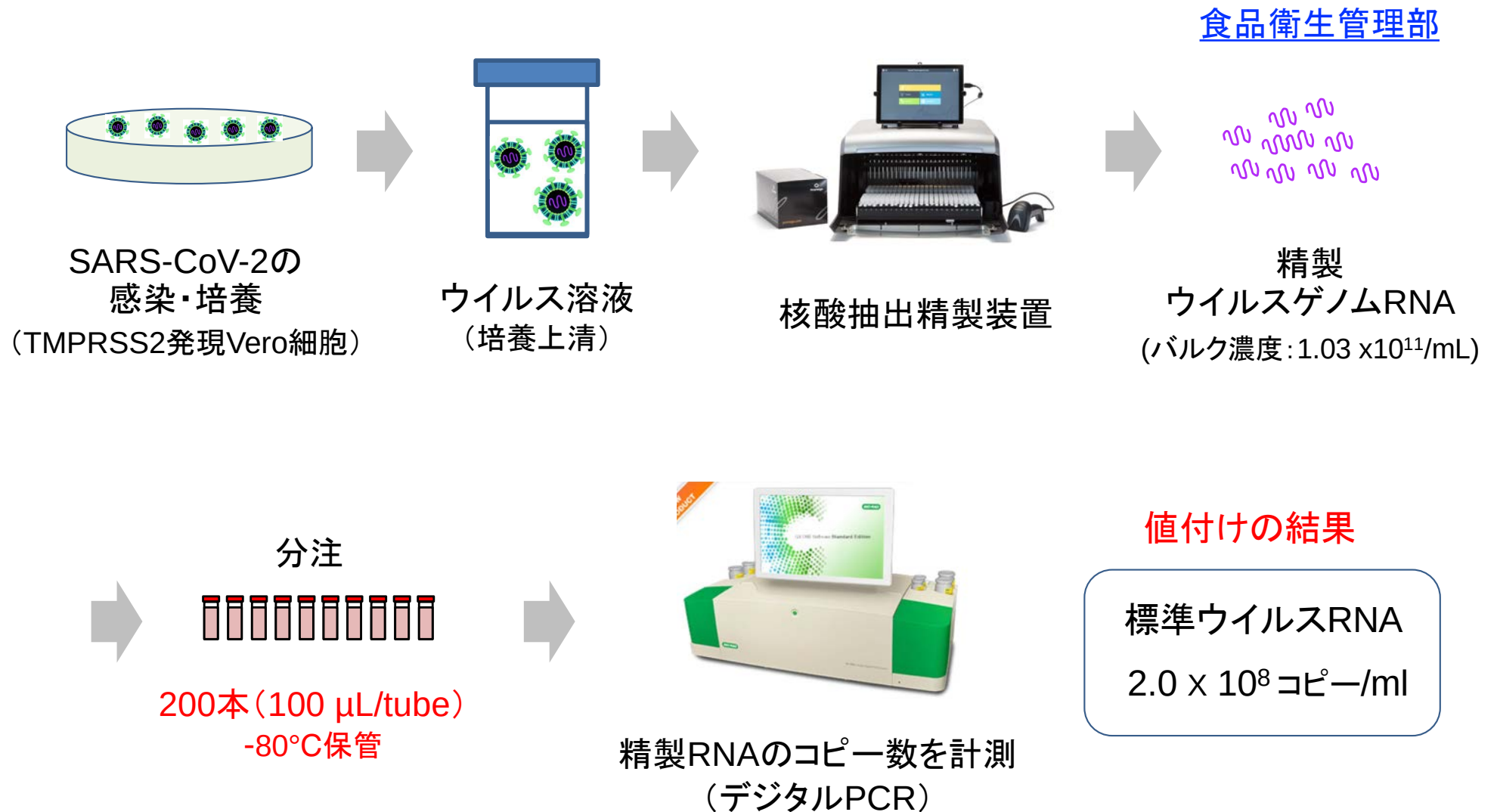
企業名(五十音順)	反応原理	RNA抽出から測定までの操作	RNA精製	検体使用量(μL)	反応系に持ち込む計算上の検体量(μL)
アークレイ	PCR	手動	有	200	16
栄研化学	等温増幅	手動	有, 無	140	23
MBL(医学生物学研究所)	PCR	手動	有	100	25
キヤノンメディカルシステムズ	等温増幅	手動	有	140	12
杏林製薬	PCR	手動	有	140	12
シスメックス	PCR	手動	有	140	23
島津製作所	PCR	手動	無	5	5
タカラバイオ	PCR	手動	無	8	8
タカラバイオ	PCR	手動	無	4.8	4.8
ダナフォーム	等温増幅	手動	有	140	23
東ソー	等温増幅	全自動	有	200	60
東洋紡	PCR	手動	有	140	9.3
東洋紡	PCR	手動	無	8	8
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	750	48
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	750	75
ビオメリュー・ジャパン	PCR	全自動	有	300	(算出不可)
富士フイルム和光純薬	PCR	全自動	有	140	44
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	140	12
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	140	12
プレシジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	300	30
プレシジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	300	60
プレシジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	150	15
プロメガ	PCR	手動	有	140	14
ベックマン・コールター	PCR	全自動	有	300	(算出不可)
ホロジックジャパン	等温増幅	全自動	有	360	92
ライフテクノロジーズジャパン	PCR	手動	有	400	40
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	手動	有	200	40
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	全自動	有	400	216

模擬ウイルスの概要

- ✓ 「AccuPlex SARS-CoV-2 (full genome)」を採用 (SeraCare社) .
- ✓ 感染リスクがないため、取り扱いが容易.
- ✓ アルファウイルス (RNAゲノムを有するエンベロープウイルス) に SARS-CoV-2 のゲノム断片 (～4kb) を組み込んだ模擬ウイルス.
- ✓ 組み込まれたゲノム領域が異なる複数の模擬ウイルスが作製されており、全種類をあわせると SARS-CoV-2 の全ゲノム領域がカバーされる.



ウイルスRNAの調製



各試験の概要

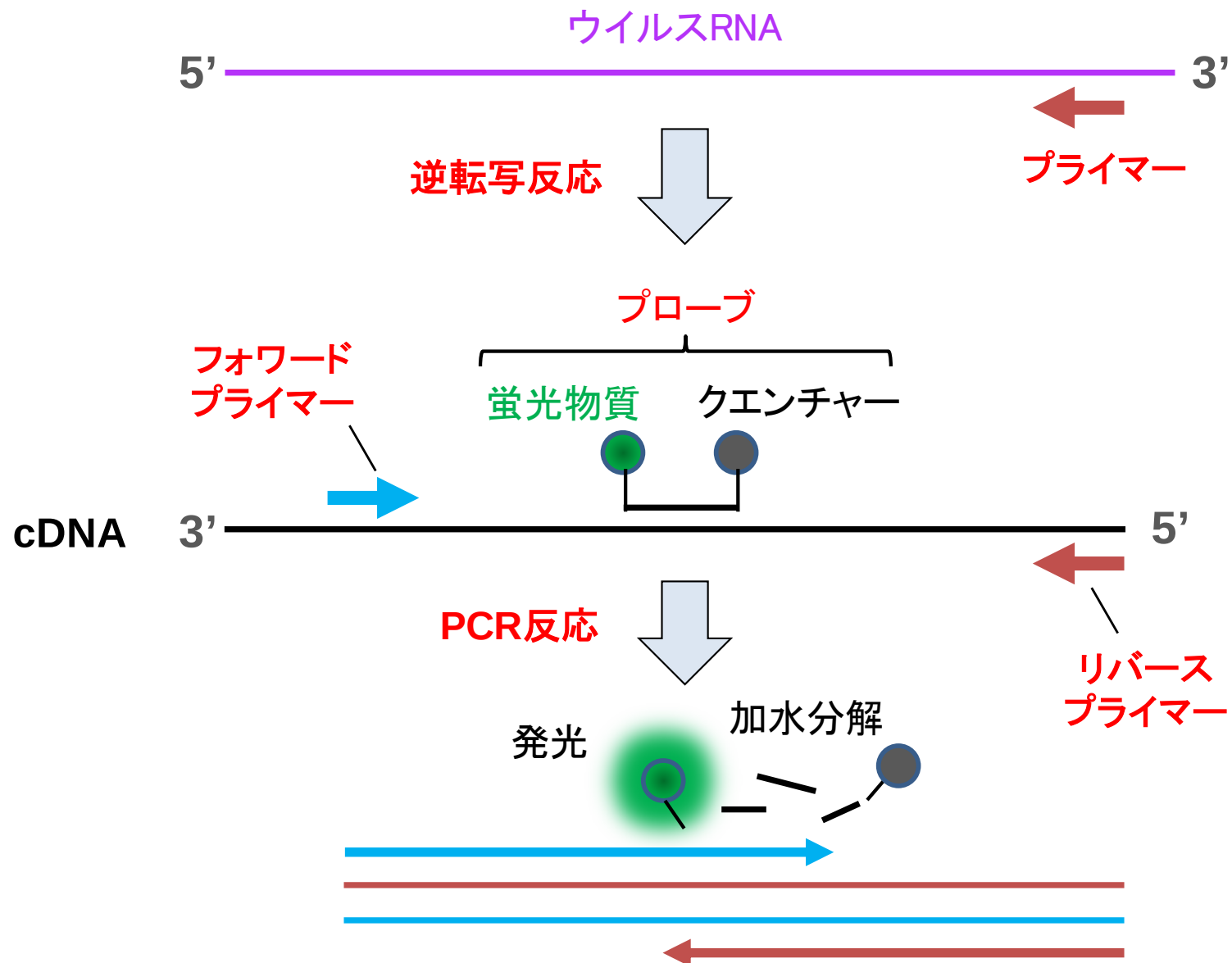
1) ウイルスRNAを用いた試験



2) 模擬ウイルスを用いた試験



PCR検査薬の核酸増幅の原理



ウイルスRNAを用いた一斉試験の結果

企業名 (五十音順)	製品名	500 コピー	200 コピー	50 コピー	20 コピー	5 コピー	0 コピー
MBL (医学生物学研究所)	MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット	100%	100%	100%	100%	83%	0%
シスメックス	2019-nCoV検出 蛍光リアルタイムRT-PCRキット	100%	100%	100%	92%	67%	0%
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)	100%	100%	100%	100%	100%	0%
タカラバイオ	SARS-CoV-2 Direct Detection RT- qPCR Kit	100%	100%	100%	100%	67%	0%
ダナフォーム	SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬	100%	100%	100%	50%	33%	33%*
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)	100%	100%	100%	83%	75%	0%
富士フイルム 和光純薬	SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit	100%	100%	100%	100%	92%	0%
プロメガ	GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (研究用試薬／COVID-19専用PCR検査薬ではない)	100%	100%	100%	100%	67%	0%
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	100%	100%	100%	83%	0%	0%

- ✓ 検証したすべての核酸増幅検査薬は、50コピー/反応のウイルスRNAを100% (12/12)の確率で「陽性」と判定した。
- ✓ 本試験条件(今回の測定プレートと測定装置の組み合わせ)において、陰性コントロール (0コピー/反応)の一部を「陽性」と判定するNAT検査薬を特定。

模擬ウイルスを用いた一斉試験の結果

企業名 (五十音順)	製品名	RNA 精製	反応系に持ち込 む計算上の検体 量 (μL)	43000 コピー/mL	17000 コピー/mL	4300 コピー/mL	1700 コピー/mL	430 コピー/mL	170 コピー/mL	0 コピー/mL
アークレイ	i-densy Pack UNIVERSAL SARS-CoV-2 キット	有	16	100%	100%	100%	100%	83%	33%	0%
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	有	23	100%	100%	100%	100%	83%	50%	0%
MBL(医学生物学研究所)	MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット	有	25	100%	100%	100%	100%	100%	100%	17%
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	有	12	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
杏林製薬	SARS-CoV-2 GeneSoC ER 杏林	有	12	100%	100%	100%	100%	100%	33%	0%
シスメックス	2019-nCoV検出蛍光リアルタイムRT-PCRキット	有	23	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
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)	無	5	100%	100%	100%	100%	83%	33%	0%
タカラバイオ	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit	無	8	100%	100%	100%	67%	17%	0%	0%
タカラバイオ	SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit ver.2	無	4.8	100%	100%	100%	67%	0%	17%	0%
ダナフォーム	SmartAmp 2019 新型コロナウイルス検出試薬	有	23	100%	100%	100%	100%	67%	33%	0%
東ソー	2019新型コロナウイルスRNA検出試薬 TRCReady SARS-CoV-2	有	60	100%	100%	100%	100%	67%	0%	0%
東洋紡	ジーンキューブ SARS-CoV-2	有	9.3	100%	100%	100%	100%	100%	83%	0%
東洋紡	新型コロナウイルス検出キット SARS-CoV-2 Detection Kit-Multi	無	8	100%	100%	100%	100%	33%	33%	0%
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	有	48	100%	100%	100%	100%	17%	17%	0%
日本ベクトン・ディッキンソン	BD マックス SARS-CoV-2	有	75	100%	100%	100%	83%	100%	83%	0%
ピオメリュー・ジャパン	FilmArray 呼吸器パネル 2.1	有	(算出不可)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
富士フイルム和光純薬	ミュータスワコー COVID-19	有	44	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
富士フイルム和光純薬	SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit	有	12	100%	100%	100%	100%	83%	50%	0%
富士フイルム和光純薬	SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit ver.2	有	12	100%	100%	100%	100%	100%	83%	0%
プレジジョン・システム・サイエンス	VIASURE SARS-CoV-2 PCR (ORF1ab gene, N gene)	有	30	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
プレジジョン・システム・サイエンス	LeaDEA VIASURE SARS-CoV-2 Kit	有	60	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
プレジジョン・システム・サイエンス	エリート MGB SARS-CoV-2 キット	有	15	100%	100%	100%	67%	100%	83%	0%
プロメガ	GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (研究用試薬／COVID-19専用PCR検査薬ではない)	有	14	100%	100%	100%	67%	33%	17%	0%
ベックマン・コールター	Xpert Xpress SARS-CoV-2「セフィエド」	有	(算出不可)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
ホロジックジャパン	アプティマSARS-CoV-2	有	92	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
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	有	40	100%	100%	100%	100%	100%	83%	0%
ロシュ・ダイアグノスティックス	LightMixR Modular SARS and Wuhan CoV E-gene, N gene	有	40	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
ロシュ・ダイアグノスティックス	cobas SARS-CoV-2	有	216	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%



Press Release

報道関係者 各位

令和3年2月26日

【照会先】

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子医薬部 部長 井上 貴雄（内線 1600）

（代表電話） 044（270）6600

（直通電話） 044（270）6533

「COVID-19 診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告」 を公開しました。

国立医薬品食品衛生研究所（神奈川県川崎市）では今般、令和2年度第一次補正予算「新型コロナウイルス感染症に係る体外診断薬の信頼性確保事業」の一環として「COVID-19 診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告」を公開しました。

<https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/COVID-19-NAT-test-02.pdf>

<https://www.nihs.go.jp/mtgt/covid-19info.html>

2020年初頭からの新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の拡大に伴い、COVID-19 診断用核酸増幅検査薬が緊急に開発され、我が国においても使用許可（薬事承認あるいは国立感染症研究所の評価）を受けた核酸増幅検査薬が COVID-19 の診断に幅広く用いられてきました。

国立医薬品食品衛生研究所では、国内で用いられている COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の信頼性を確認する目的で、コピー数を規定したウイルス RNA および模擬ウイルス^{注1}を用いて、核酸増幅検査薬の一斉試験を実施しました。

その結果、試験をおこなった核酸増幅検査薬はいずれも 4300 コピー/mL^{注2}のウイルス検体を検出できることが明らかとなりました。今回の一斉試験により、本試験の対象となった COVID-19 診断用核酸増幅検査薬について、一定の信頼性があることが確認されました。

^{注1} SARS-CoV-2 のゲノム RNA を感染性のないウイルスに組み込んだもの。

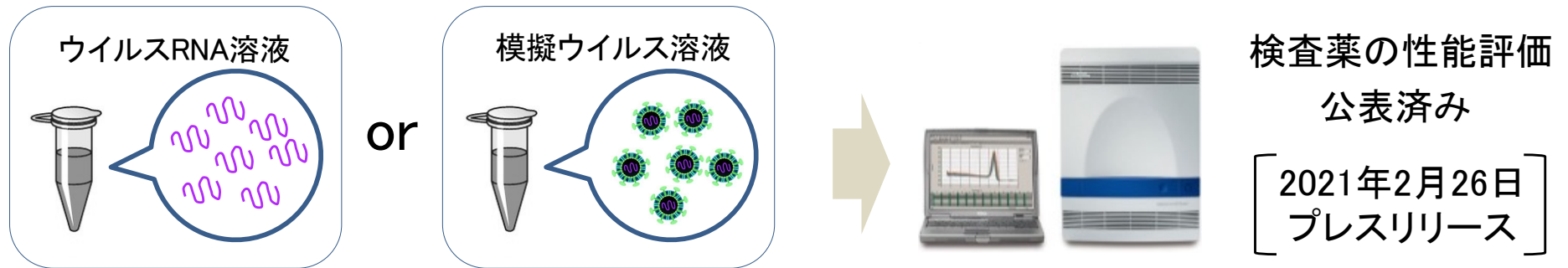
^{注2} 国立感染症研究所が示す病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1
(<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) に記載される方法を用いた場合、「50 コピー/反応」に相当するウイルス濃度。

本日の話題

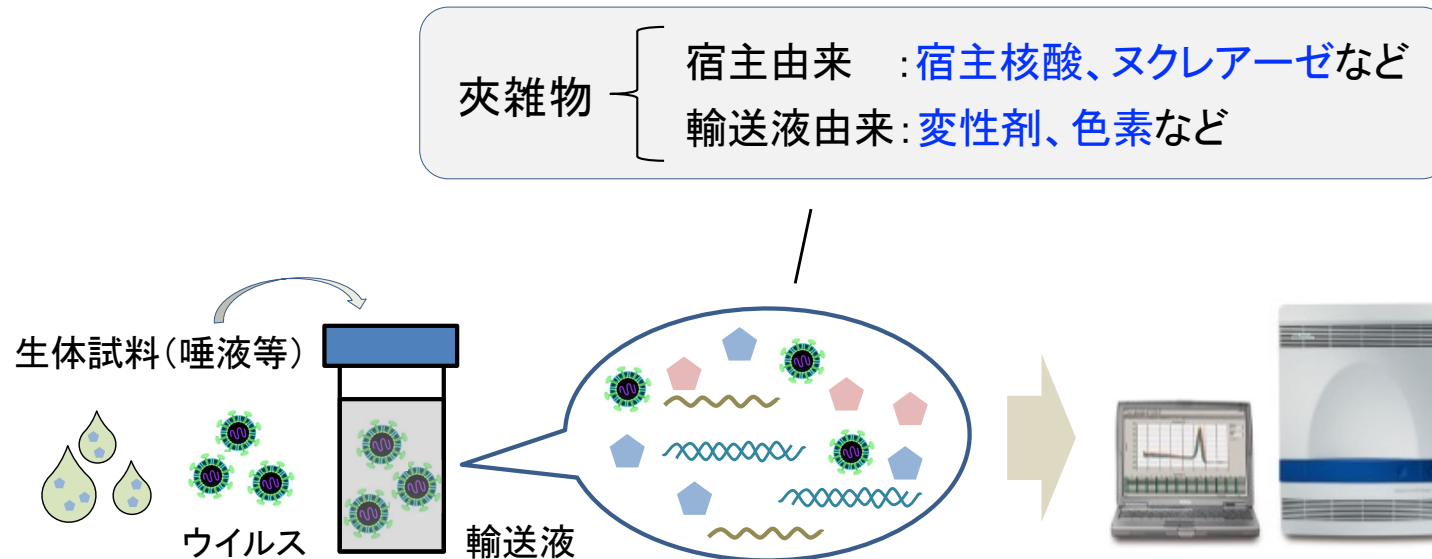
1. COVID-19診断用核酸増幅検査薬の性能評価
2. 緊急開発される核酸増幅検査薬の信頼性確保に向けた取り組み
3. 新型コロナワクチンの輸送の影響に関する検証

反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討

● 夾雑物を含まない試料を用いた試験



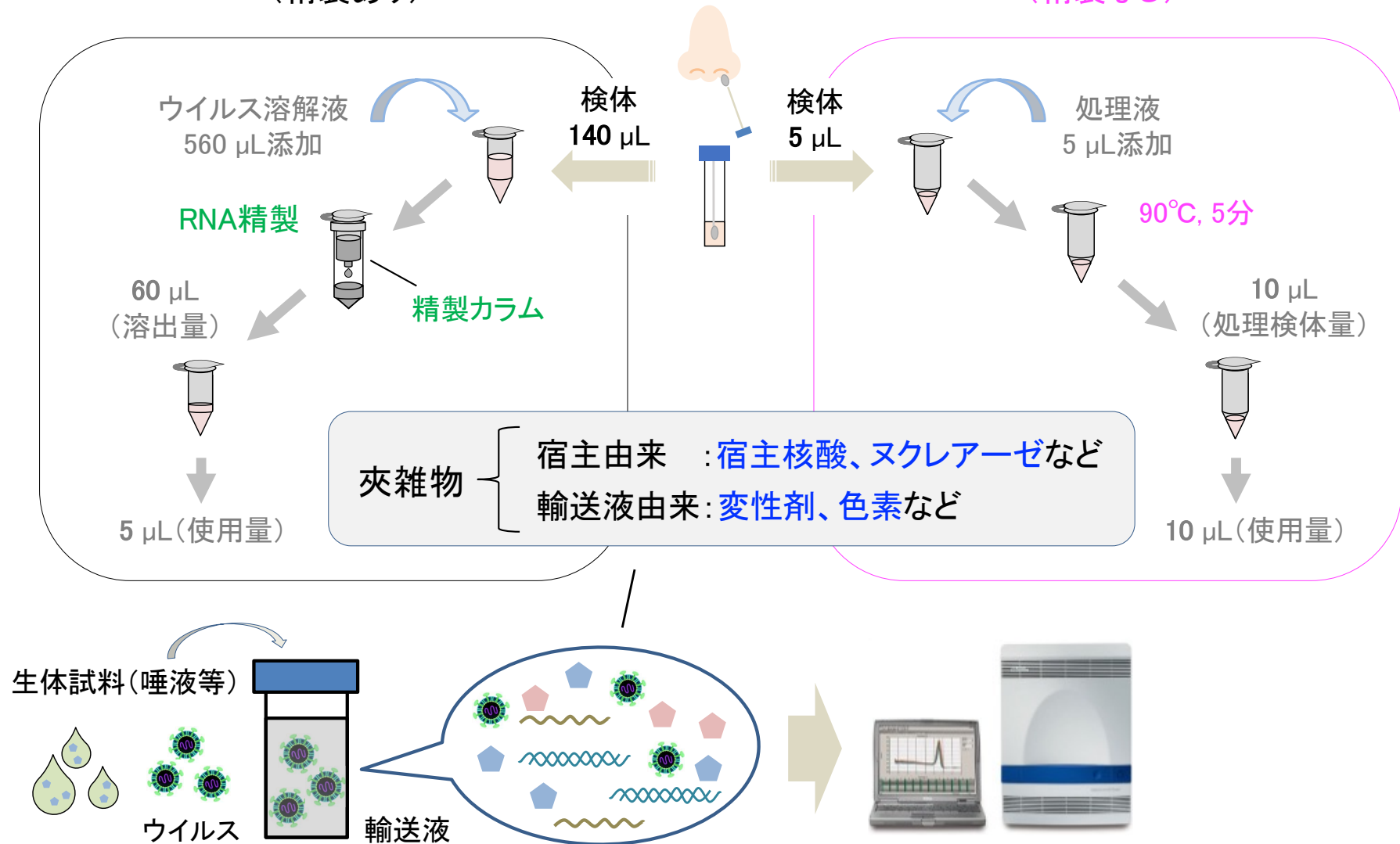
● 夾雑物を含む試料を用いた試験



反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討

「精製RNA」を用いる検査薬
(精製あり)

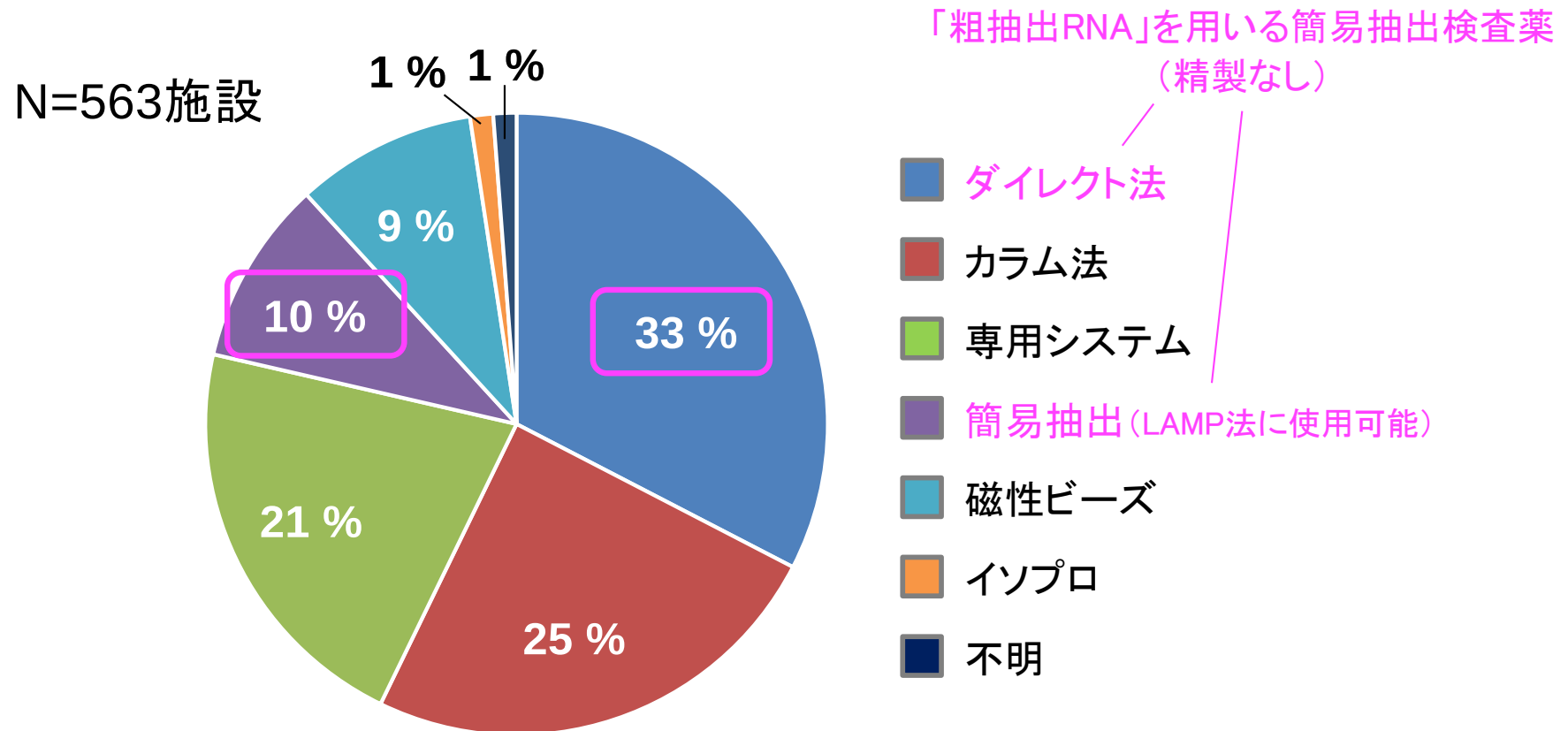
「粗抽出RNA」を用いる簡易抽出検査薬
(精製なし)



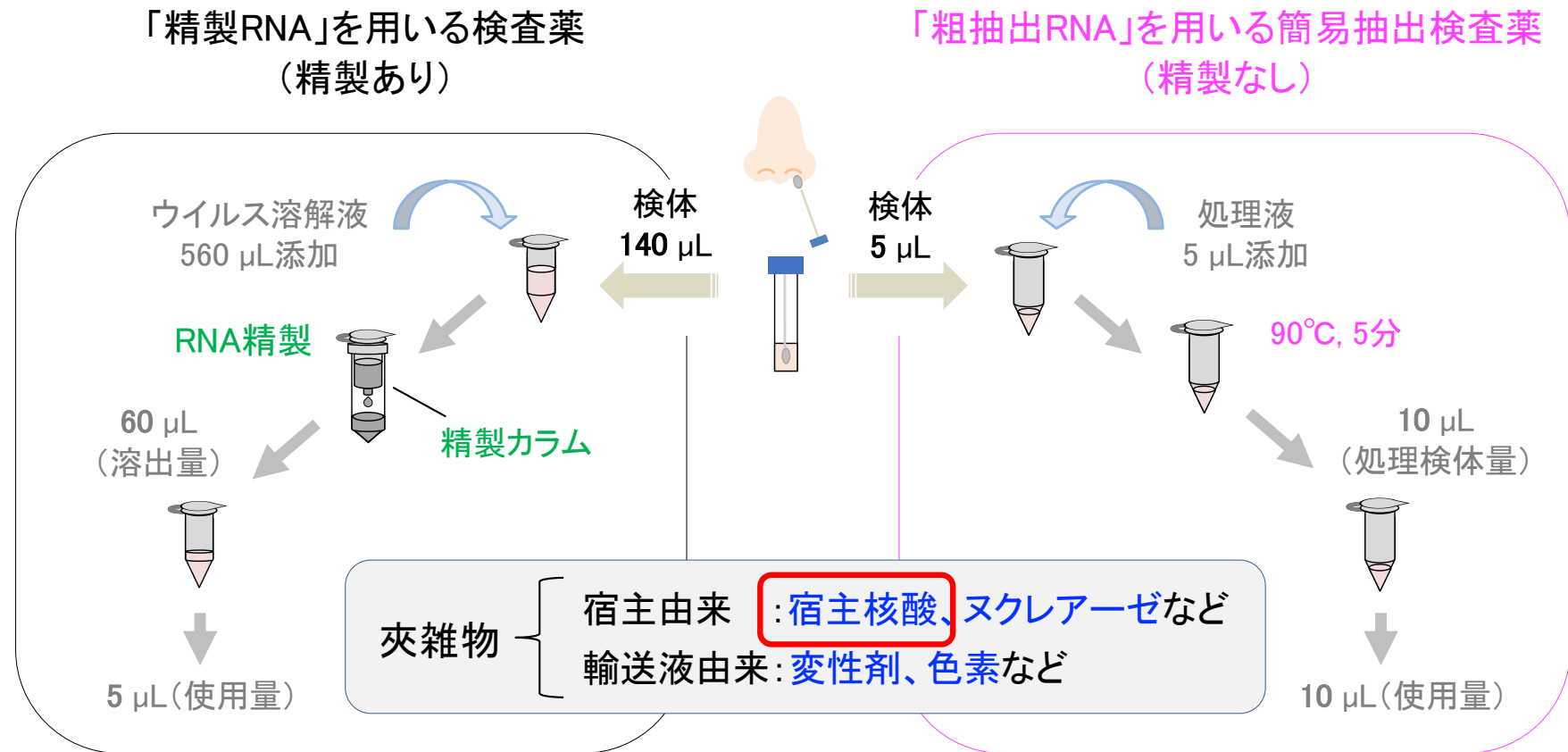
緊急で使用許可を受けたCOVID-19診断用NAT検査薬:28品目

企業名(五十音順)	反応原理	RNA抽出から測定までの操作	RNA精製	*反応時間	増幅領域	プライマーセット数
アークレイ	PCR	手動	有	通常	N	1
栄研化学	等温増幅	手動	有, 無	迅速	ORF1ab, N	2
MBL (医学生物学研究所)	PCR	手動	有	通常	N	2
キヤノンメディカルシステムズ	等温増幅	手動	有	迅速	非公開	1
杏林製薬	PCR	手動	有	迅速	ORF1ab, E	2
シスメックス	PCR	手動	有	通常	ORF1ab	1
島津製作所	PCR	手動	無	通常	N	2
タカラバイオ	PCR	手動	無	迅速	N	2
タカラバイオ	PCR	手動	無	迅速	N	2
ダナフォーム	等温増幅	手動	有	迅速	ORF1ab	1
東ソー	等温増幅	全自動	有	迅速	N	1
東洋紡	PCR	手動	有	通常	N	2
東洋紡	PCR	手動	無	通常	N	2
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	通常	N	2
日本ベクトン・ディッキンソン	PCR	全自動	有	通常	N	2
ビオメリュー・ジャパン	PCR	全自動	有	通常	S, M	2
富士フイルム和光純薬	PCR	全自動	有	迅速	ORF1ab, S	2
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	迅速	N	2
富士フイルム和光純薬	PCR	手動	有	迅速	N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, N	2
プレジジョン・システム・サイエンス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, ORF8	2
プロメガ	PCR	手動	有	通常	N	2
ベックマン・コールター	PCR	全自動	有	通常	N, E	2
ホロジックジャパン	等温増幅	全自動	有	通常	ORF1ab	2
ライフテクノロジーズジャパン	PCR	手動	有	通常	ORF1ab, S, N	3
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	手動	有	通常	N, E	2
ロシュ・ダイアグノスティックス	PCR	全自動	有	通常	ORF1ab, E	2

検査施設が採用する核酸抽出法



反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討



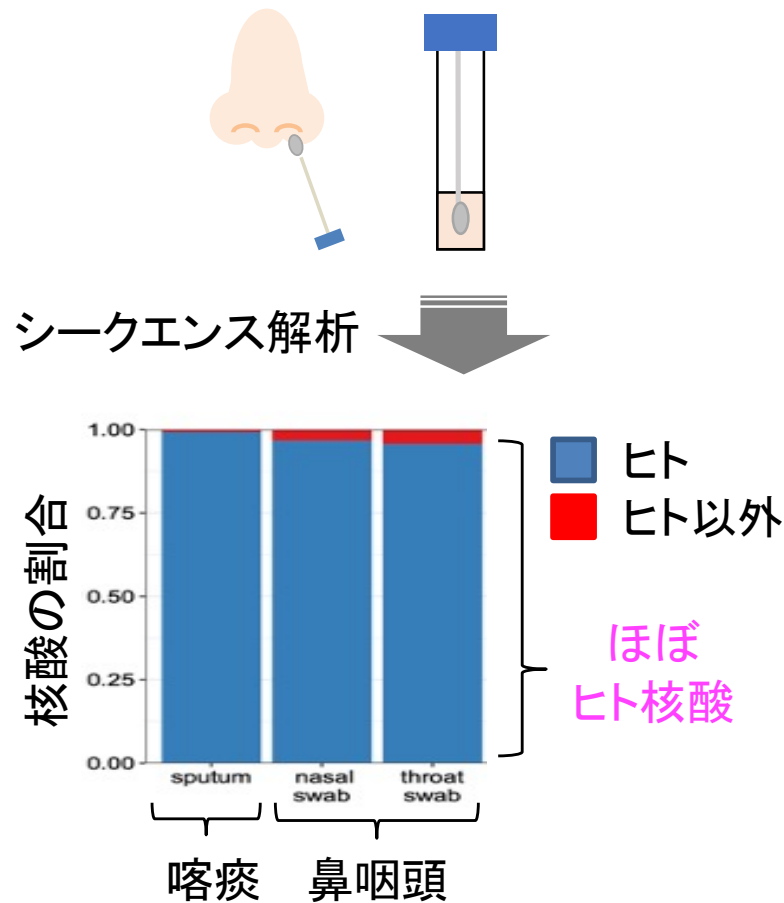
- ✓ 夾雑物の除去が可能
- ✓ RNAの濃縮が可能
- ✓ 多くの量の検体を反応系に持ち込むことが可能

- ✓ ひとつのチューブで前処理が完了
- ✓ 簡便・時短・安全
- ✓ 検査所で高いニーズ

夾雑物を含む検体を用いた検証 → 簡易抽出検査薬に関する留意事項を明確化
(偽陰性の低減)

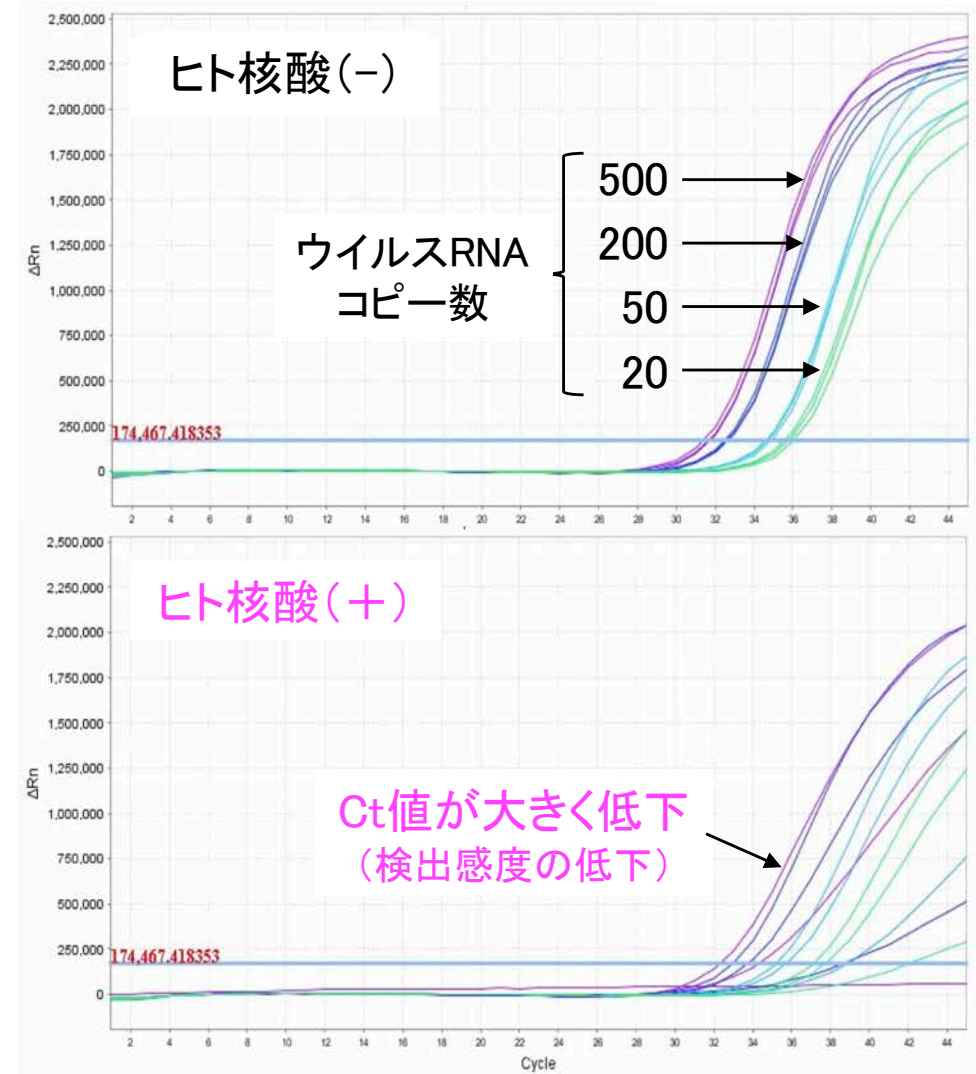
反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討 (宿主核酸)

臨床検体中のヒト核酸の割合



Genome Med. 12(1), 57, 2020

パイロット検証



プライマーとヒト核酸の交差性が核酸増幅反応に与える影響を明確化
(偽陰性の低減)

関連生物種核酸とプライマーの交差性に関する検討

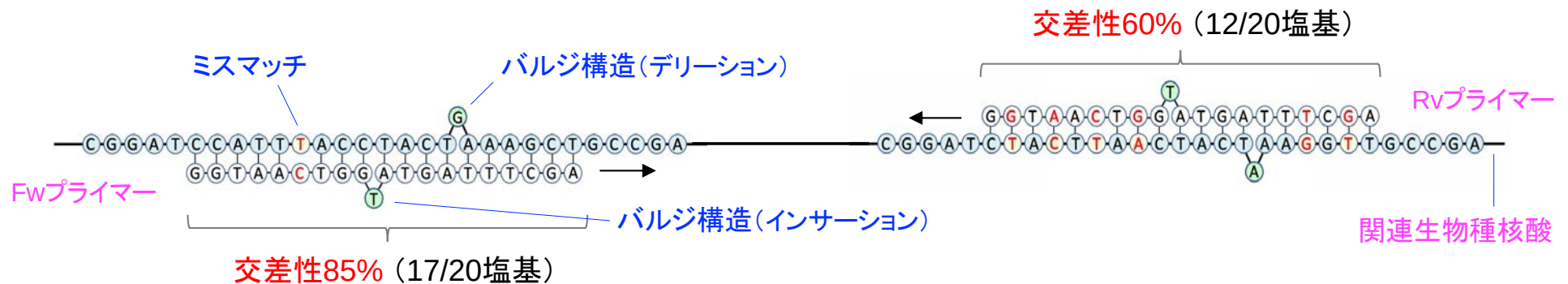
	Organisms	Division	Genus/Species	WHO EUL	U.S. EUA
ヒトコロナウイルス	SARS-CoV-2	VRL (ウイルス)			
	Human coronavirus 229E	VRL (ウイルス)		+	+
	Human coronavirus OC43	VRL (ウイルス)		+	+
	Human coronavirus HKU1	VRL (ウイルス)		+	+
	Human coronavirus NL63	VRL (ウイルス)		+	+
	SARS-coronavirus	VRL (ウイルス)		+	+
	MERS-coronavirus	VRL (ウイルス)		+	+
	Adenovirus	VRL (ウイルス)		+	+
	Human Metapneumovirus (hMPV)	VRL (ウイルス)		+	+
✓ 呼吸器に由来する検体に存在しうる生物 ✓ COVID-19と似た症状を引き起こす生物	Parainfluenza 1 - 4	VRL (ウイルス)		+	+
	Influenza A	VRL (ウイルス)		+	+
	Influenza B	VRL (ウイルス)		+	+
	Enterovirus	VRL (ウイルス)		+	+
	Respiratory Syncytial Virus	VRL (ウイルス)		+	+
	Rhinovirus	VRL (ウイルス)		+	+
	Chlamydomydia pneumoniae	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Haemophilus influenzae	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Legionella pneumophila	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Mycobacterium tuberculosis	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Streptococcus pneumoniae	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Streptococcus pyogenes	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Bordetella pertussis	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Mycoplasma pneumoniae	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Pneumocystis jirovecii (PJP)	PLN (植物・真菌類など)		+	+
	Influenza C	VRL (ウイルス)		+	
	Parechovirus	VRL (ウイルス)		+	
	Candida albicans	PLN (植物・真菌類など)		+	+
	Corynebacterium diphtheriae	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Legionella (non-pneumophila)	BCT (バクテリア)	Genus (属)	+	
	Bacillus anthracis (Anthrax)	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Moraxella catarrhalis	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Neisseria elongata and Neisseria meningitidis	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Pseudomonas aeruginosa	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Staphylococcus epidermidis	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Streptococcus salivarius	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	+
	Leptospira sp.	BCT (バクテリア)	Genus (属)	+	
	Chlamydomydia psittaci	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Coxiella burnetii (Q-Fever)	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	
	Staphylococcus aureus	BCT (バクテリア)	Species (種)	+	

関連生物種核酸とプライマーの交差性に関する検討

【現状】 プライマー設計の指針(WHOおよびFDA緊急使用許可ガイダンス)

関連生物種の核酸配列との相補性80%以上で「交差反応の可能性あり」

→ ウェット検証(実際にPCRをかけて増幅しないことを確認する)



【課題】

- ✓ 現在の基準では, 理論的にどのプライマーも関連生物種核酸に相当数ヒットする.
- ✓ 実際に検査に用いられているプライマーについても, 相当数ヒットする.
 - 「交差性(相補性)」の定義があいまい(ミスマッチに加え, バルジ構造を考慮する必要がある)
 - BLASTでは正確な検索は原理的に不可 → 膨大な検索漏れが生じている.

プライマーと関連生物種核酸の相補結合部位の数(理論値)

低く見積もっても

関連生物種核酸の総塩基長

ミスマッチの数

相補結合部位の数の理論値

$$X = \frac{1.58 \times 10^8}{4^n} \times n C_m \times 3^m$$

プライマーの塩基長

相補性80%以上の結合部位

MM:ミスマッチ

塩基長	0 MM	1 MM	2 MM	3 MM	4 MM	5 MM	6 MM
22	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	0.4	5.3	58	490
21	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	0.1	1.3	18	178	1425
20	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	0.2	4.4	57	543	4072
19	<10 ⁻¹	<10 ⁻¹	0.9	15	181	1629	>10 ⁴
18	<10 ⁻¹	0.1	3.2	51	572	4801	>10 ⁴
17	<10 ⁻¹	0.5	11	169	1778	>10 ⁴	>10 ⁴

現在の基準では、理論的にどのプライマーも関連生物種核酸に相当数ヒットする

COVID-19診断用プライマー交差性解析システムの整備・公開 (2020年5月29日プレスリリース)

関連生物種ゲノムデータベース の構築(国立衛研)

ヒト
コロナウイルス

Organisms	WHO EUL	U.S. EUA
SARS-CoV-2		
Human coronavirus 229E	+	+
Human coronavirus OC43	+	+
Human coronavirus HKU1	+	+
Human coronavirus NL63	+	+
SARS-coronavirus	+	+
MERS-coronavirus	+	+
Adenovirus		
Human Metapneumovirus (hMPV)	+	+
Parainfluenza 1 - 4	+	+
Influenza A	+	+
Influenza B	+	+
Enterovirus	+	+
Respiratory Syncytial Virus	+	+
Rhinovirus	+	+
Chlamydia pneumoniae	+	+
Haemophilus influenzae	+	+
Legionella pneumophila	+	+
Mycobacterium tuberculosis	+	+
Streptococcus pneumoniae	+	+
Streptococcus pyogenes	+	+
Bordetella pertussis	+	+
Mycoplasma pneumoniae	+	+
Pneumocystis jirovecii (PJP)	+	+
Influenza C		
Parechovirus	+	
Candida albicans	+	+
Corynebacterium diphtheriae	+	
Legionella (non-pneumophila)	+	
Bacillus anthracis (Anthrax)	+	
Moraxella catarrhalis	+	
Neisseria elongata and Neisseria meningitidis	+	
Pseudomonas aeruginosa	+	+
Staphylococcus epidermidis	+	+
Streptococcus salivarius	+	+
Leptospira sp.	+	
Chlamydia psittaci	+	
Coxiella burnetii (Q-Fever)	+	
Staphylococcus aureus	+	

その他の
関連生物種

+

漏れのない検索エンジン: GGGenome (ライフサイエンス統合データベースセンター)

超絶高速ゲノム配列検索

Help | English

正確・迅速・簡便

GGGenome

AAATTTTGGGACCAGGAAC

検索

① プライマー配列を入力

データベース:

CoV

SARS-CoV-2 complete genomes, GenBank 2020/5/19

Cross-reactivity check for COVID-19 diagnostic primers (7 CoV + 32 organisms in WHO EUL), NIHS 2020/5/1

Cross-reactivity check for COVID-19 diagnostic primers (7 CoV + 20 organisms in US EUA), NIHS 2020/5/1

Cross-reactivity check for COVID-19 diagnostic primers (7 CoV), NIHS 2020/5/1

Cross-reactivity check for COVID-19 diagnostic primers (5 beta-CoV), NIHS 2020/5/1

② 検索したいデータベースを選択

○ ミスマッチ/ギャップを許容 ● ミスマッチのみ許容 : 4 塩基まで (検索する配列長の25%まで)
● 双方向を検索 ○ +方向のみ検索 ○ -方向のみ検索

③ 検索条件を入力

Results:

④ 結果が表示される

検索語に色がつきます (ミスマッチ・挿入欠失)。

NC_045512.2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome

position: 29125-29144

CGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCAAGGAAATTTTGGGACCAGGAACATATCAGACAAGGAAGCTGATTACAAACATT

NC_004718.3 SARS coronavirus, complete genome

position: 28974-28993

TGGGAGACGTGGTCCAGAACAAACCAAGGAAATTTTGGGACCAGGAACATATCAGACAAGGAAGCTGATTACAAACATT

NC_002929.2 Bordetella pertussis Tohama I, complete genome

position: 374624-374643

TGCAGGCGGATTGGGTCTGACTATTTCGATTTTGGGACCAGGAACAGGCCGTCGGCCGATTGGGGCGTTGGCC

NC_002929.2 Bordetella pertussis Tohama I, complete genome

position: 1861704-1861723

GTTCTATTACATGCCGCTCGAATGCGCAAGATTGGGCGCCAGGAACAGTGTGTAAGCCTGATGGCGCCGCTGCACG

COVID-19診断用プライマー交差性解析システムの整備・公開

(2020年5月29日:プレスリリース)

開発国	プライマー の名称	プライマー の長さ	ヒット配列の数					ヒット配列の例 (相補結合領域のアライメント)	ヒットした生物種 ミスマッチ数 交差性	
			0	1	2	3	4			
フランス	FR-Pasteur nCoV_ IP2-12669Fw	18	0	1	17	290	3969	ATGAGGTTATTCCAGTTG ATGAGCTTAGTCCTGTTG	NW_017264787.1 Primer(+鎖)	ニューモシスチス 3 83%
	FR-Pasteur nCoV_ IP2-12759Rv	18	0	2	26	464	5583	ACAACACAACCAAAGGAG ACAACACAACAAAGGGAG	NC_002017.1 Primer(-鎖)	インフルエンザ 2 89%
	FR-Pasteur nCoV_ IP4-14059Fw	19	0	0	11	153	1685	GGTAAATGGTATGATTTTG GGTAACTGGTATGATTTG	NC_006213.1 Primer(+鎖)	コロナOC43 2 89%
	FR-Pasteur nCoV_ IP4-14146Rv	20	0	0	2	15	313	CTTAAATTCACCTTTACCAG CCTATATTAACTTTGACCAG	NC_000912.1 Primer(-鎖)	マイコプラズマ 4 80%
ミスマッチ + バルジ	FR-Pasteur nCoV_ IP4-14059Fw	19	0	0	30	726	13580	GGTAACAGGTA-GATTTTCG GGTAACGGTATGATTTTCG	NZ_KL370759.1 Primer(+鎖)	レジオネラ ミスマッチ1+ 挿入1 89%

各国で設計された国家プライマーのほとんどが交差性80%以上になることを確認済み

- ✓ そもそも「交差性80%」に科学的根拠はない
- ✓ そもそも片方のプライマーだけがヒットしただけでは増幅しない



ウェット検証を求める基準の明確化

- 交差性の基準は何パーセントが妥当か
- ヒットした位置関係の検討(増幅領域の長さ)

COVID-19診断用NAT検査薬の緊急開発の経緯

2020年	1月10日	新型コロナウイルスの遺伝子配列が判明
	1月14日	国内初感染者を確認
	1月30日	ウイルスの分離に成功(感染研)
	2月初旬	検査薬会社が開発に着手(厚労省の依頼)
	3月 4日	「臨床検体パネル」配布を開始(感染研:数量限定)
	3月中旬～	一定の基準を満たすNAT検査薬の使用を許可

感染拡大初期の段階

- ✓ 臨床検体および分離ウイルスの入手が困難
- ✓ ウイルスの危険性が未知のため、開発企業は安全面の対応に苦慮
- ✓ インビトロ転写RNAであれば早期に入手可能

性能評価に用いる検体の検討

擬似検体

必要な条件

開始可能時期

①

インビトロ転写RNA(部分配列)
5' → 3'
合成DNA(部分配列)

+

生体試料(唾液等)



ゲノム配列の解読

直後

②

ウイルスゲノムRNA(全長)
ORF1ab S E N

+

生体試料(唾液等)

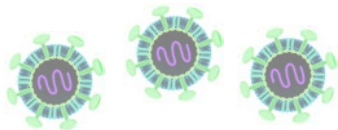


ウイルス培養系の確立

3週間

③

不活化ウイルス



+

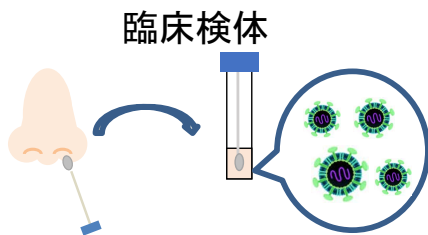
生体試料(唾液等)



培養ウイルスの不活化

3週間

④



陽性検体の確保

2ヶ月

インビトロ転写RNAスパイク検体による性能評価の手法・適切性を検証

緊急開発されるNAT検査薬の信頼性確保に関する留意事項の取りまとめ

【準備状況】

- ✓ 緊急開発されたNAT検査薬の一斉性能評価
- ✓ 主要開発企業との面談(約10社), NAT検査薬の包括的調査(約30キット)
- ✓ 課題・懸念点の洗い出し

【検討事項】

● ウェット研究

- ✓ 反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討
- ✓ 関連生物種核酸とプライマーの交差性に関する検討
- ✓ 性能評価に用いる検体の検討

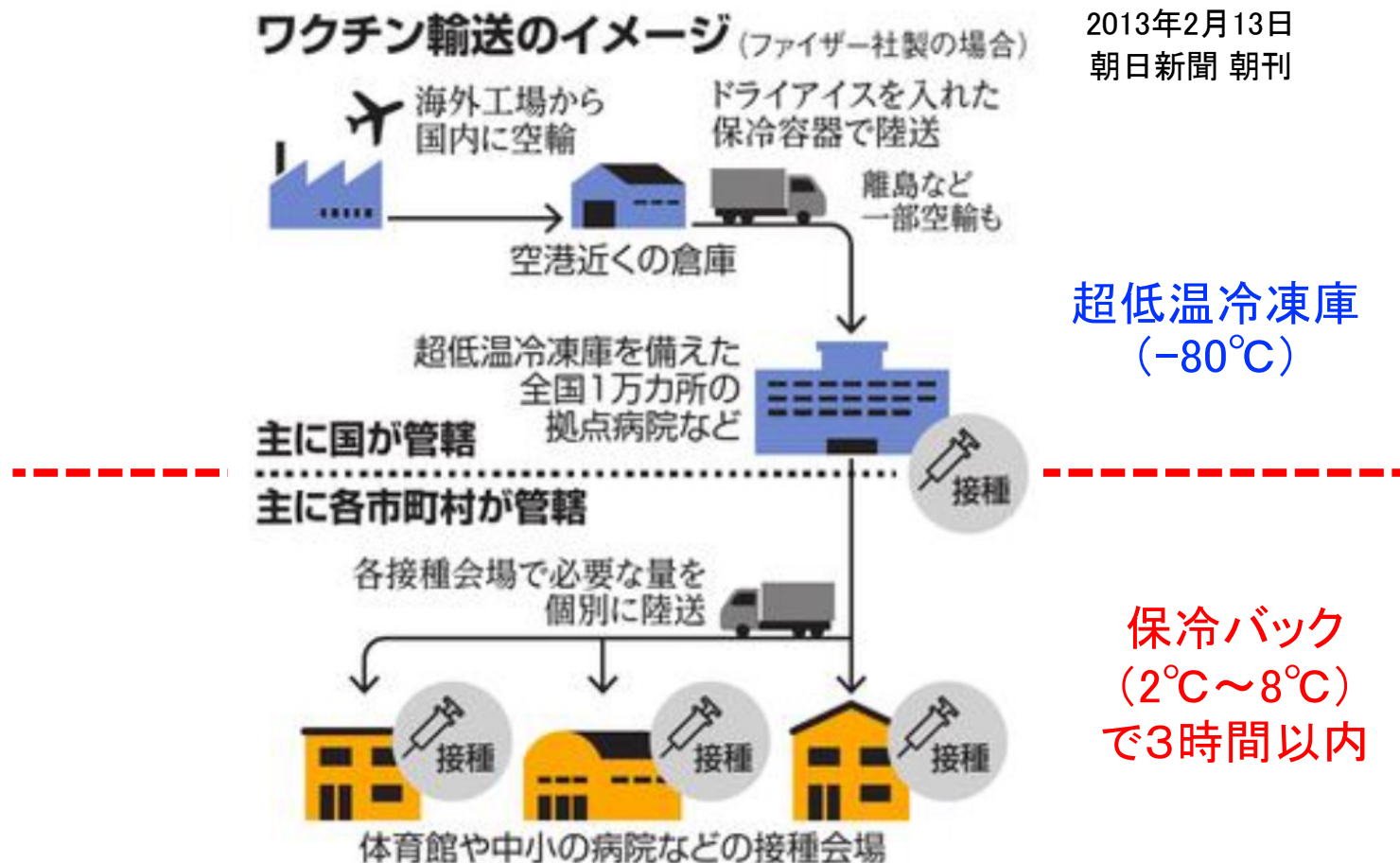
● ドライ研究(文書作成)

- ✓ プライマーの品質 : 製造過程でのコンタミ
- ✓ プライマーセットの数 : 5品目は1セットのみ
- ✓ 構成試薬の数 : 3品目はプレミックスなし
- ✓ 核酸増幅の内部標準 : 10品目は内部標準なし
- ✓ 判定方法, 基準 : 設定基準が多様
- ✓ 反応原理 : 偽陽性が起こりやすい検査薬の特定

本日の話題

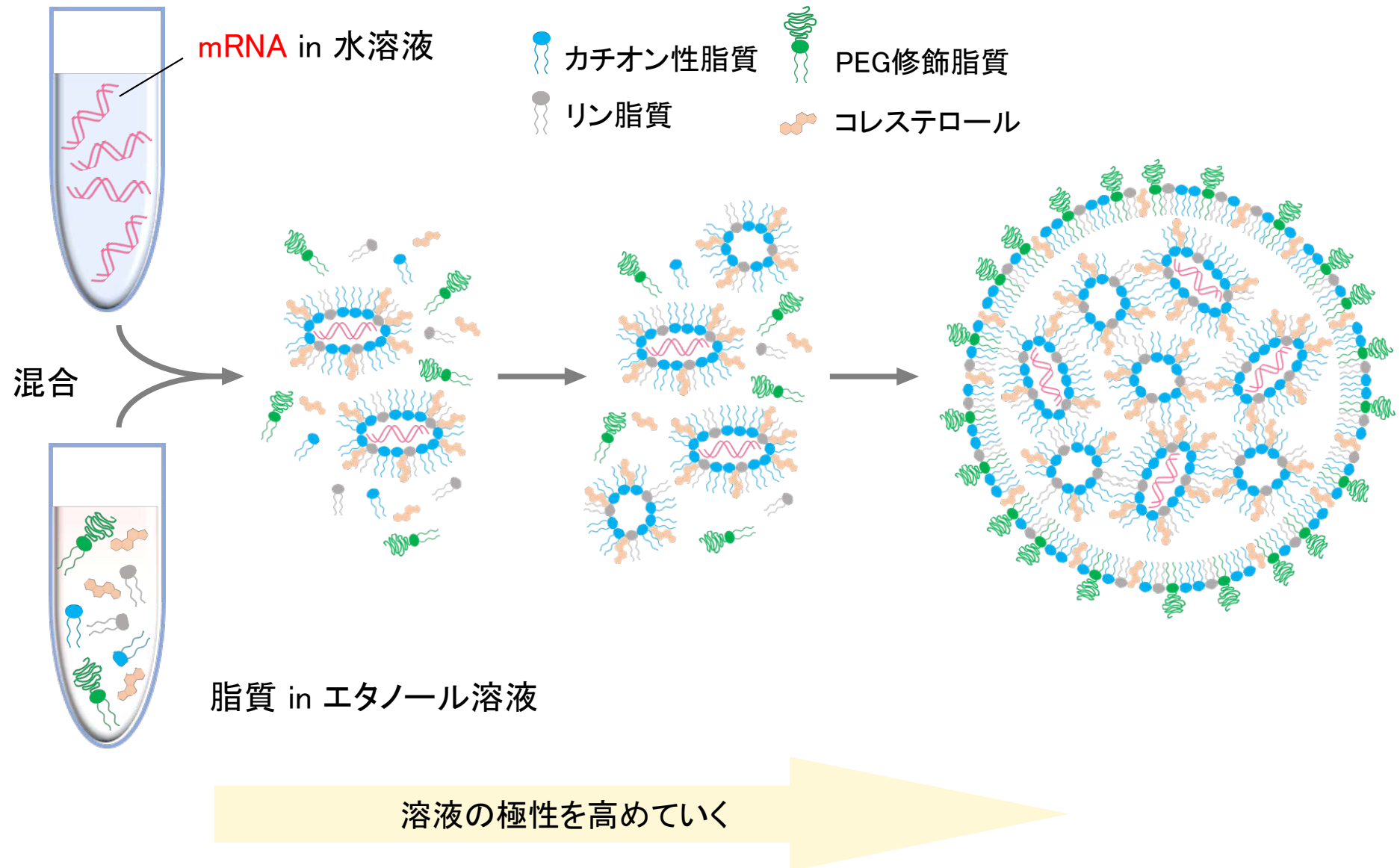
1. COVID-19診断用核酸増幅検査薬の性能評価
2. 緊急開発される核酸増幅検査薬の信頼性確保に向けた取り組み
3. 新型コロナワクチンの輸送の影響に関する検証

コミナティの輸送の影響に関する検証

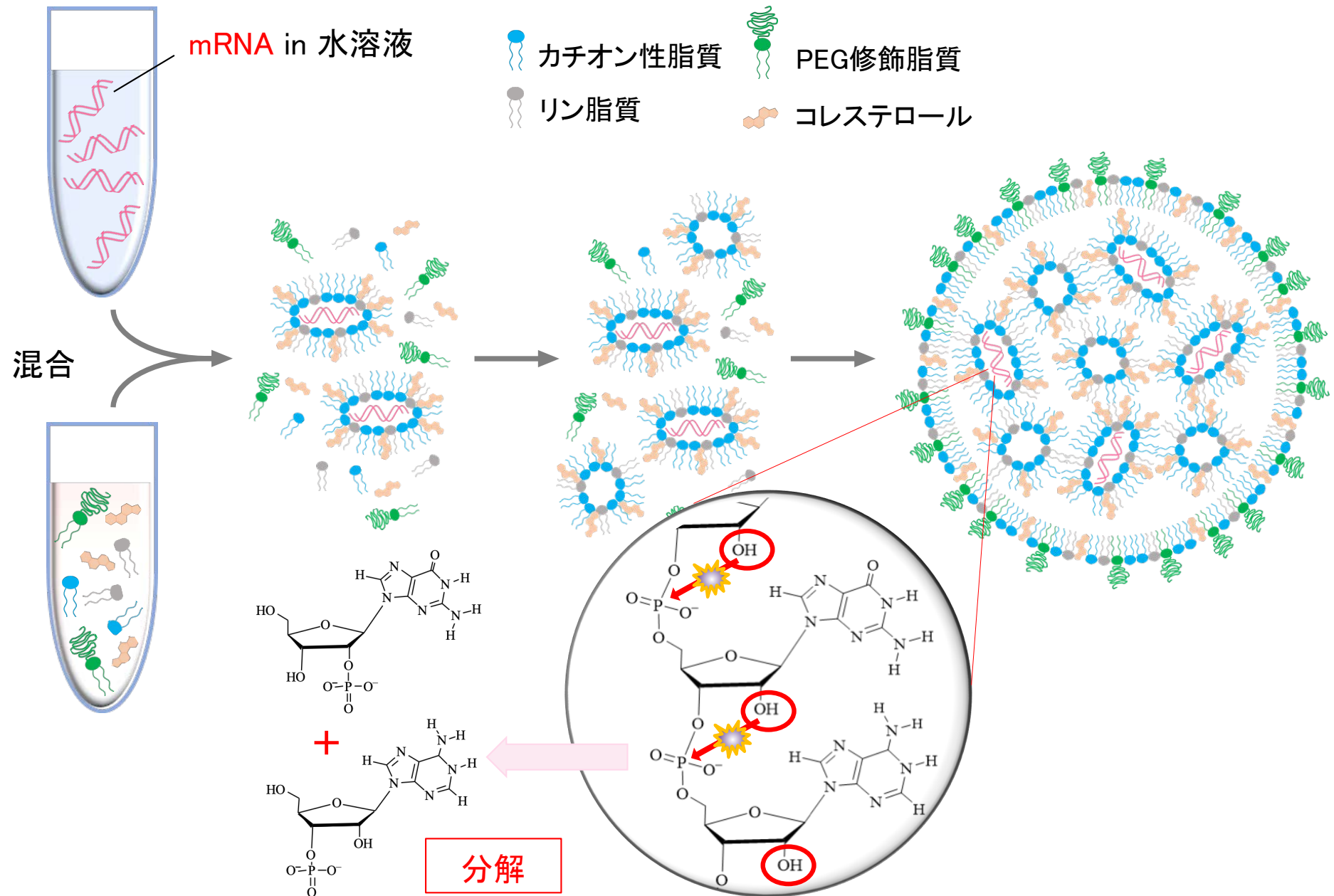


超低温冷凍庫(-80℃)を備えた拠点から接種会場への輸送については、通常、「2℃～8℃で3時間以内」に輸送することとされている。

mRNAワクチン = mRNA搭載脂質ナノ粒子



mRNAワクチン = mRNA搭載脂質ナノ粒子



コロナワクチン輸送にバイク便不可 厚労省が手引き改定

新型コロナウイルス

姫野直行 2021年2月10日 21時51分



米ファイザーの新型コロナワクチン=同社提供

厚生労働省は、米ファイザー社製の新型コロナウイルスのワクチンについて、揺れによって品質が落ちる可能性が指摘されたため、輸送にバイクや自転車を使うことを避けるように自治体向けの手引を改定した。9日付の事務連絡で全国の自治体に周知した。

同社のワクチンは15日にも承認され、来週半ばから医療従事者への接種が始まる見通し。約250カ所の診療所での個別接種を中心とする東京都練馬区が輸送にバイク便などを想定していた。

手引では輸送方法も具体的に示され、ワクチンの瓶を立てた状態で容器に固定し、保冷バッグに入れて運ぶ。輸送時間は原則3時間以内で、離島など特別な事情があっても12時間を超えることはできないとした。

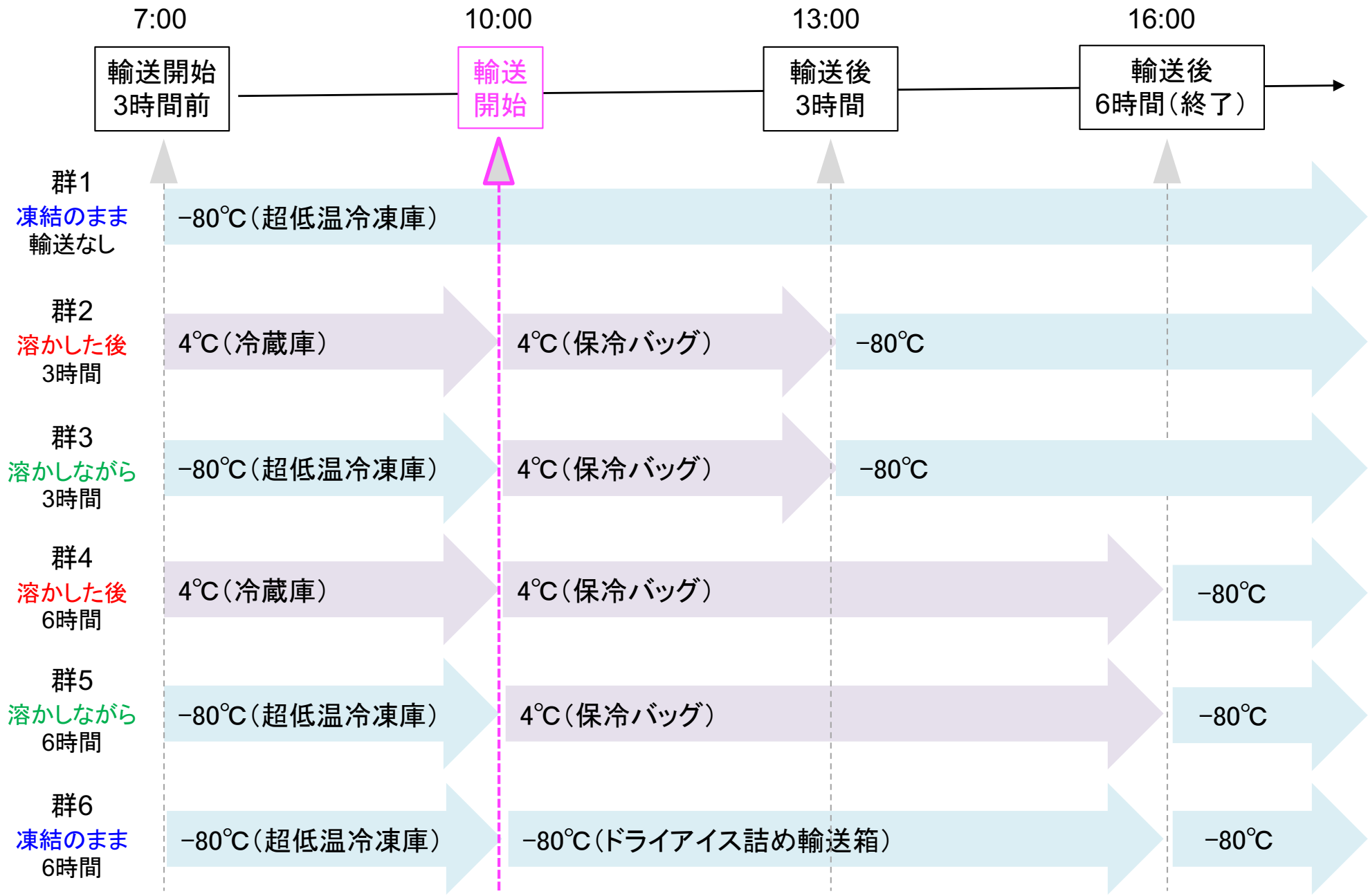
輸送検証試験:概要

- ✓ 国内の状況に合わせた条件(2℃～8℃, 3時間以内)を念頭に, 路上輸送試験を実施.
- ✓ 3時間の輸送に加えて, 6時間の輸送を検証.「解凍してから輸送」する条件に加え,「解凍しながら輸送」についても検証.
- ✓ コミナティに含まれるmRNAの解析(キャピラリーゲル電気泳動)ならびにタンパク質発現解析(ウェスタンブロット)を実施.

*群	時間	輸送開始時の状態	輸送中の状態	梱包(温度)
1 (N=1)	0	凍結(輸送なし)		超低温冷凍庫で保管(-80℃)
2 (N=3)	3	解凍	解凍	保冷バッグ(2-8℃)
3 (N=3)	3	凍結	凍結→解凍	保冷バッグ(2-8℃)
4 (N=3)	6	解凍	解凍	保冷バッグ(2-8℃)
5 (N=3)	6	凍結	凍結→解凍	保冷バッグ(2-8℃)
6 (N=3)	6	凍結	凍結	ドライアイス詰め輸送容器(-80℃)

*同一ロットのコミナティ筋注のバイアルを計16本使用.

輸送検証試験: 概要



輸送検証試験：走行ルート



- ✓ 国立衛研(川崎市川崎区殿町)を起点に、横浜方面を走行。
- ✓ 車内と保冷バッグ内の温度をロガーで記録。
- ✓ 輸送開始から3時間後と6時間後に、国立衛研において輸送試験後のバイアルを回収。
- ✓ 実際にコミナティの輸送を担う業者が、実際に輸送に用いる車種で輸送を実施。

実際の輸送よりも長時間 & 長距離

走行道路	時間(概算)	距離(概算)
一般道	1:50	39.4 km
高速道	0:40	33.4 km
一般道 (国立衛研周辺)	微調整	微調整
計	3:00	72.8 + α km

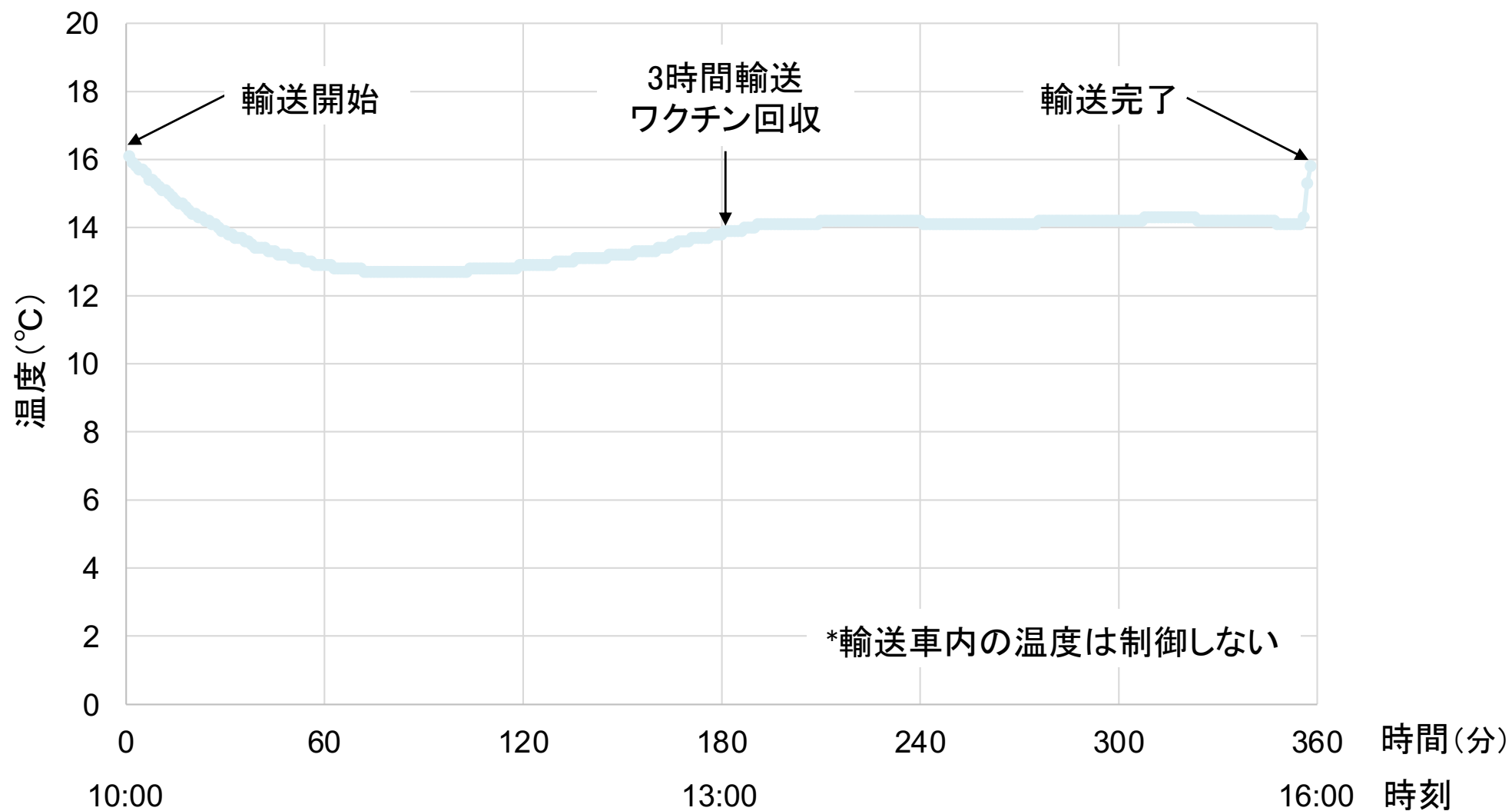


後半ルート(高速道)

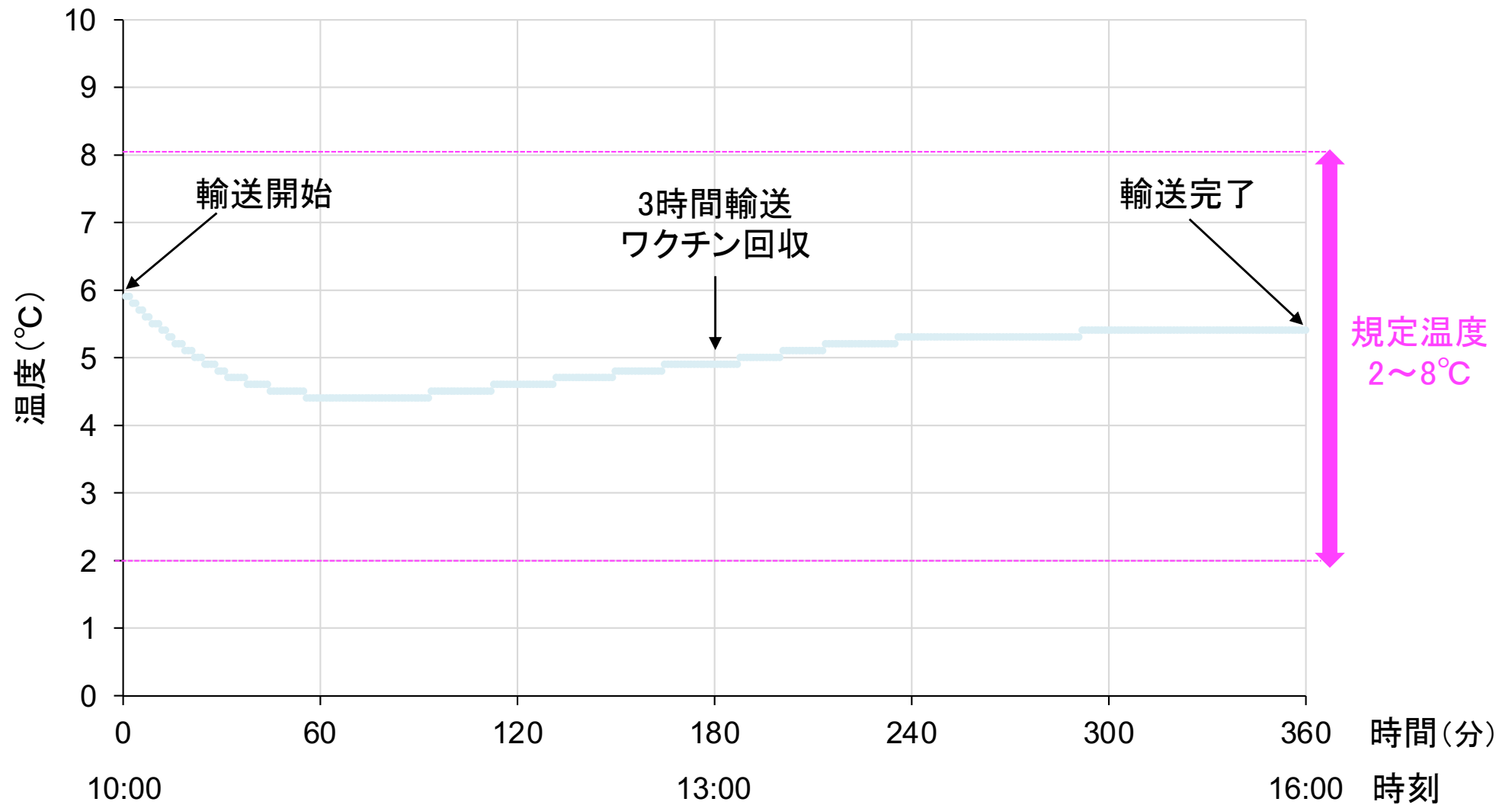
輸送試験に使用した車両と保冷バッグの外観



輸送車内の温度変化



保冷バッグ内の温度変化



体内

筋細胞

核

スパイクタンパク質

翻訳

抗原提示細胞

免疫応答

2. スパイクタンパク質の発現解析

コミナティをヒト由来培養細胞に添加し、発現するスパイクタンパク質の量をウェスタンブロットで評価.

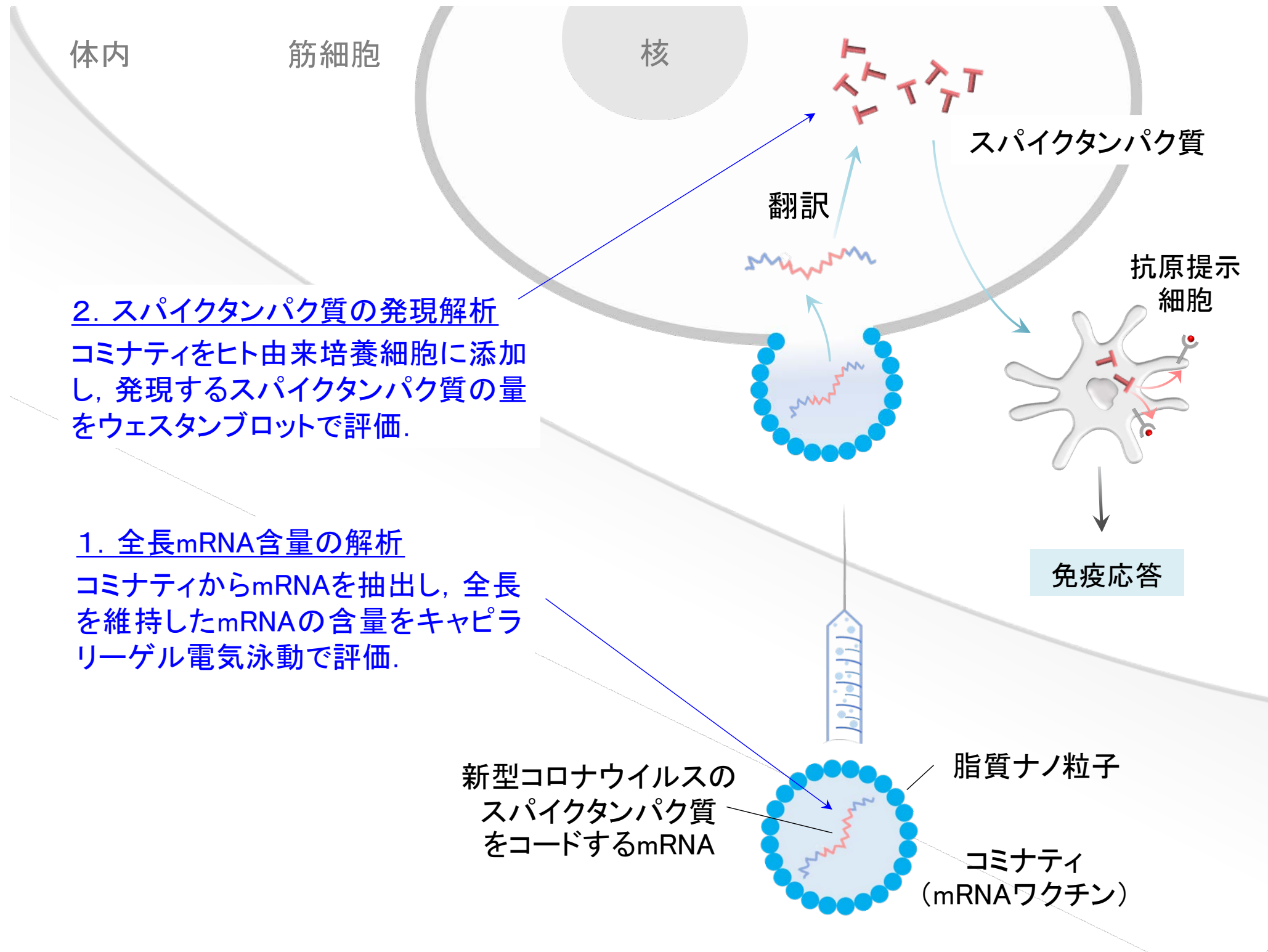
1. 全長mRNA含量の解析

コミナティからmRNAを抽出し、全長を維持したmRNAの含量をキャピラリーゲル電気泳動で評価.

新型コロナウイルスの
スパイクタンパク質
をコードするmRNA

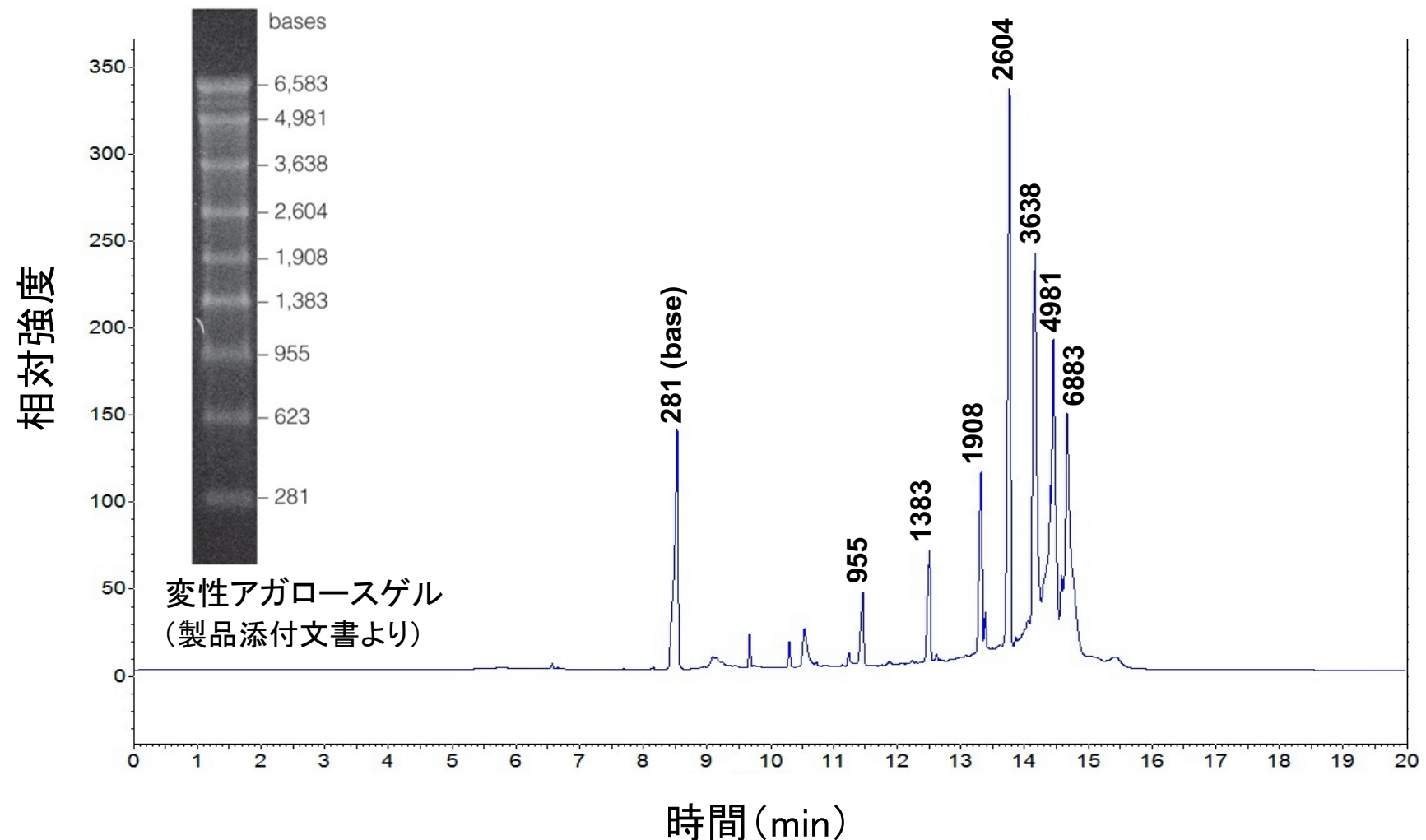
脂質ナノ粒子

コミナティ
(mRNAワクチン)

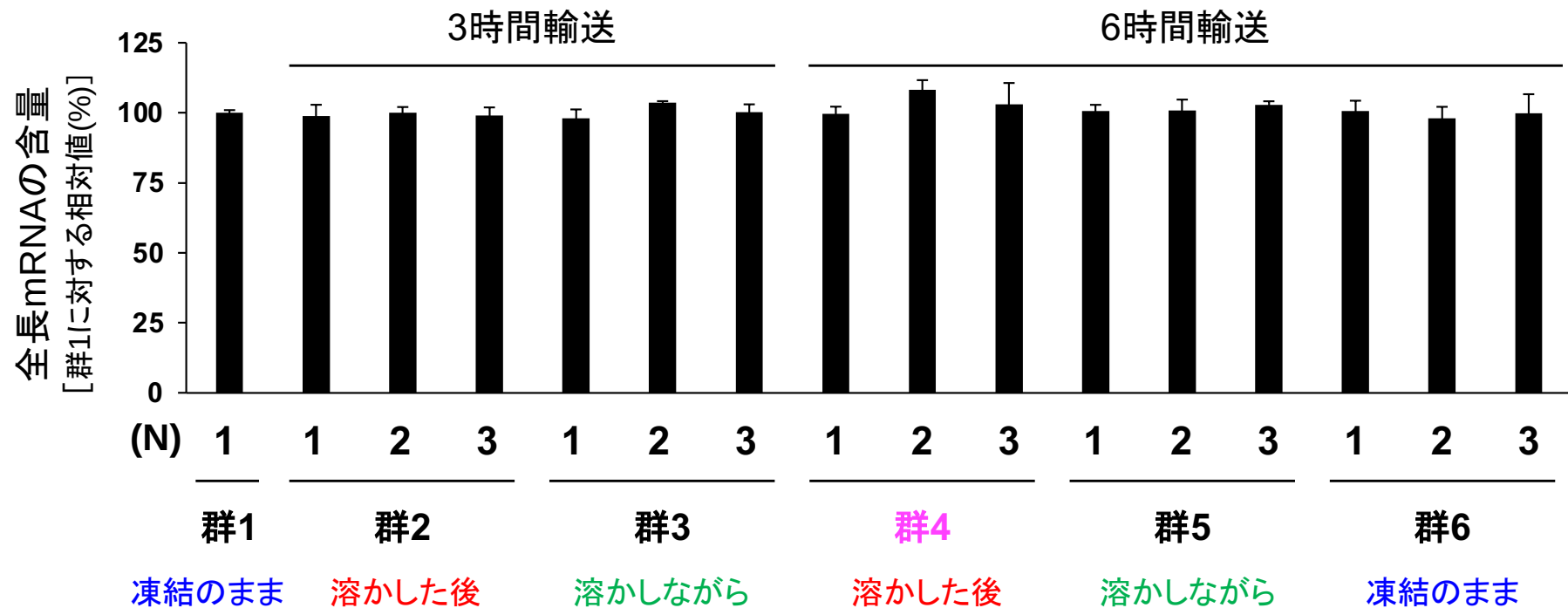


キャピラリーゲル電気泳動による全長mRNA含量の解析

試料：RNA Markers (Promega)

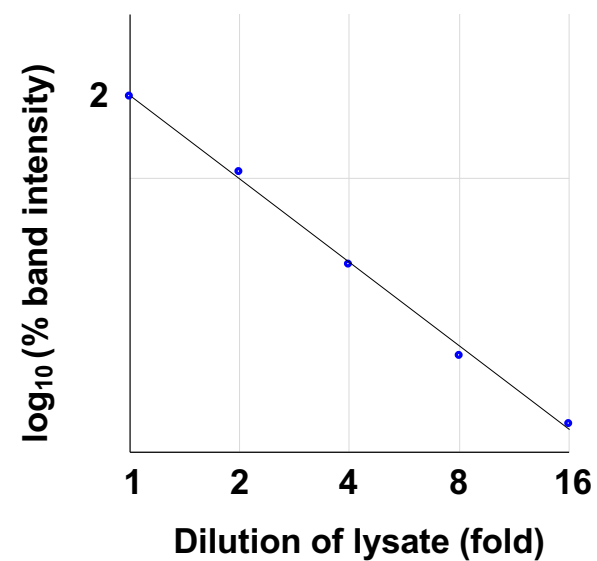
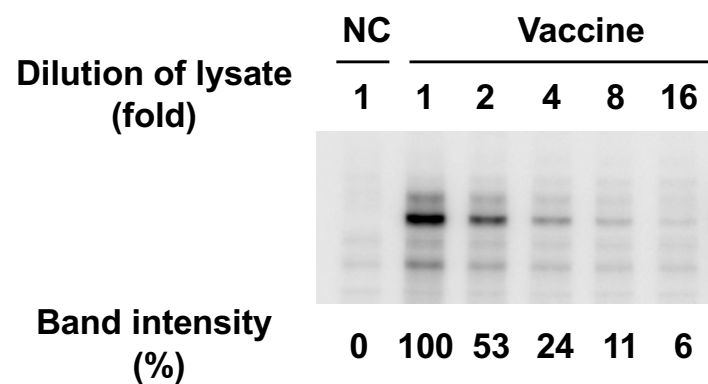


キャピラリーゲル電気泳動による全長mRNA含量の解析

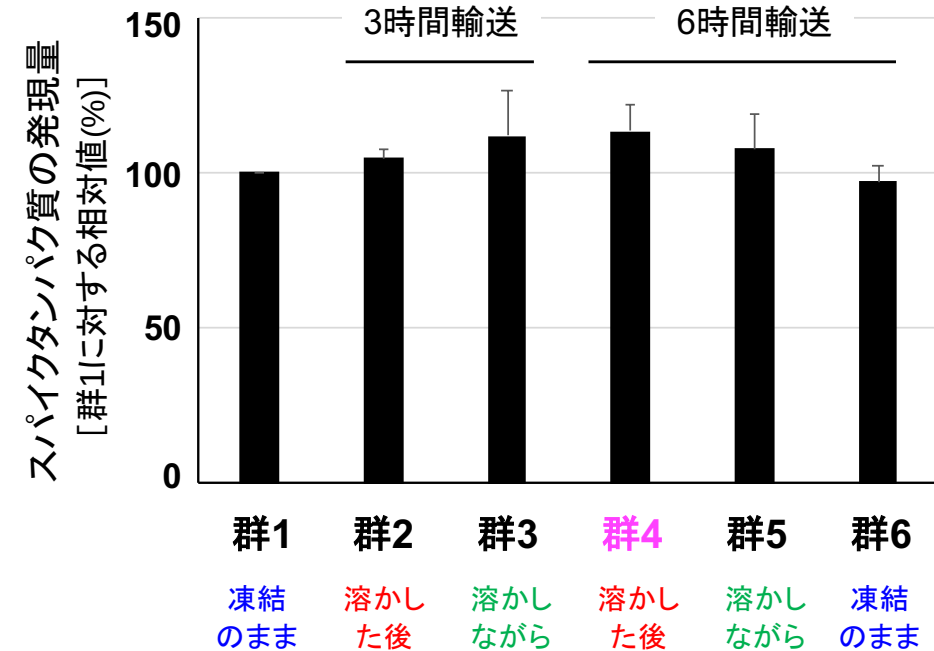
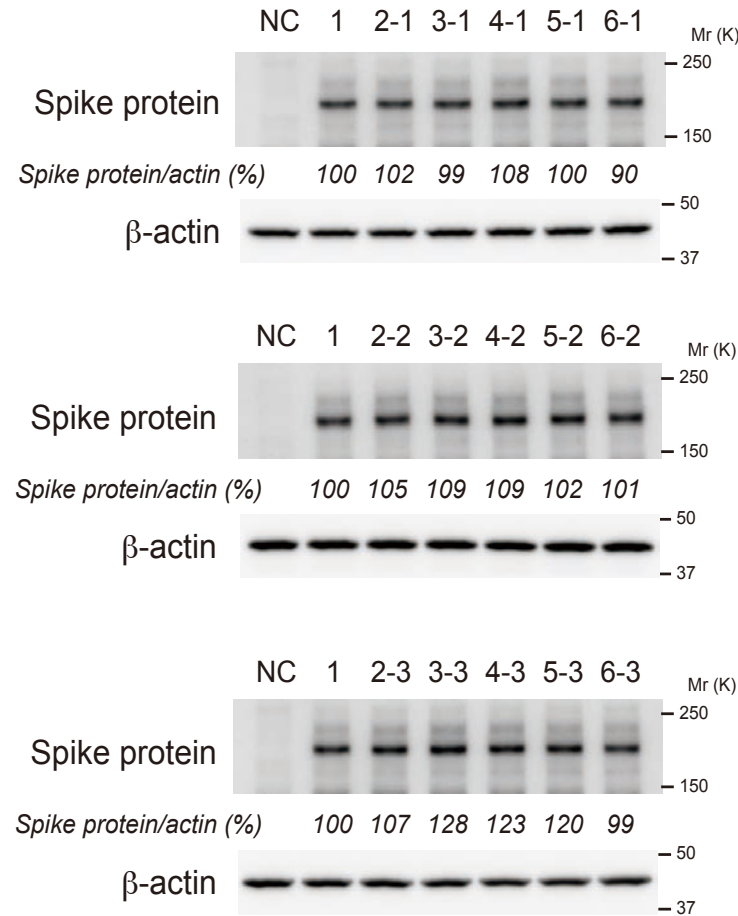


今回の輸送条件では、全長mRNAの含量
に対する影響は観察されない。

ウェスタンブロットによるスパイクタンパク質の発現解析

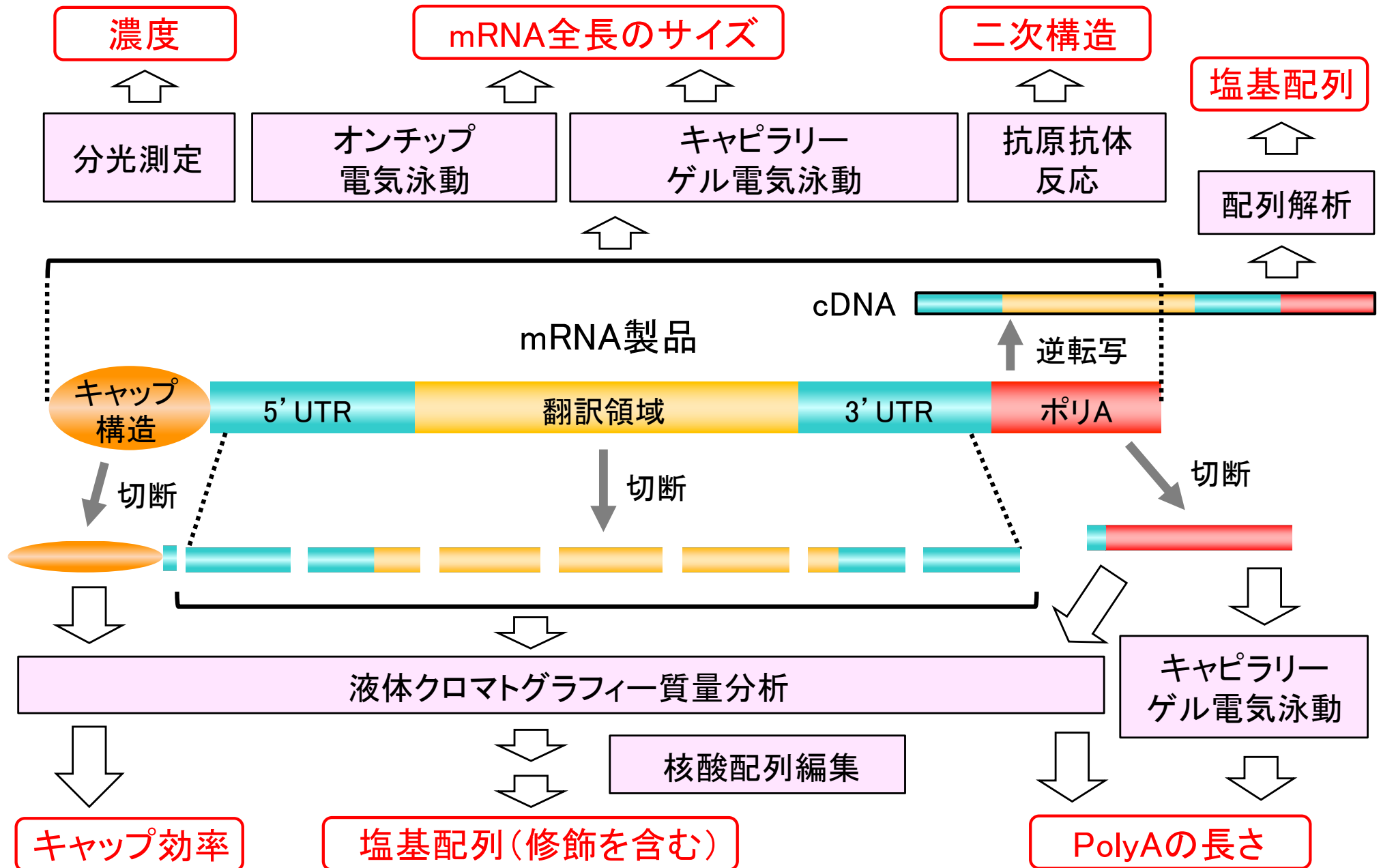


ウェスタンブロットによるスパイクタンパク質の発現解析



今回の輸送条件では、スパイクタンパク質の発現
に対する影響は観察されない。

mRNA医薬の品質評価に関する研究



まとめ

1. 正確・迅速・簡便なプライマー交差性解析システムを整備・公開した.
2. 早期に開発・許可されたCOVID-19診断用NAT検査薬の一斉試験を実施し, 一定の信頼性があることを確認した.
3. プレートと装置の組み合わせにより, 一定の割合で偽陰性が生じる検査薬を特定した.
4. 「緊急開発されるNAT検査薬の信頼性確保に関する留意事項」の文書化を念頭に, 夾雑物や交差性などに関する検討をおこなっている.
5. 新型コロナワクチンの輸送の影響に関する検証を行い, 今回の輸送条件では顕著な影響はないことを示した.
6. 「mRNAワクチン(mRNA医薬)の品質評価に関する考慮事項」の文書化を念頭に, 分析法や評価項目に関する検討をおこなっている.



ホーム

研究概要

研究業績

COVID-19関連情報

組織

第1室 (遺伝子治療担当室)
第2室 (核酸医薬担当室)
第3室 (分子標的薬担当室)
第4室 (診断薬担当室)

リンク

COVID-19 関連情報

トピックス

- ▶ [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（公開版）](#)  (2021年4月28日) **New**
- ▶ [COVID-19診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告（プレスリリース）](#)  (2021年2月26日)
- ▶ [COVID-19診断用核酸増幅検査薬一斉試験の結果報告（公開資料）](#)  (2021年2月26日)
- ▶ [米国および日本で承認されたCOVID-19診断用PCR検査薬一覧](#)  (2020年6月5日)
- ▶ [COVID-19診断用プライマー交差性解析システムの整備・公開（プレスリリース）](#)  (2020年5月29日)
- ▶ [COVID-19診断用プライマー交差性解析システムの整備・公開（公開資料）](#)  (2020年5月29日)
- ▶ [COVID-19診断用プライマー交差性解析システムの整備・公開（別表1：Excel）](#) (2020年5月29日)

