
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) RNA検査の実際

石毛崇之、村田正太、松下一之

千葉大学医学部附属病院 検査部

COVID-19に対する千葉大病院検査部の対応

2月中旬・・・SARS-CoV-2核酸検出検査の検討開始

3月中旬・・・検査の開始（紙依頼）

4月上旬・・・オンラインオーダー開始

5月11日～31日・・・入院時陰性確認検査実施

7月13日～現在・・・入院時陰性確認検査実施（休日PCR検査の開始）

➤ **8月末時点で約5000件の検査を実施**

開始当初のRT-PCR

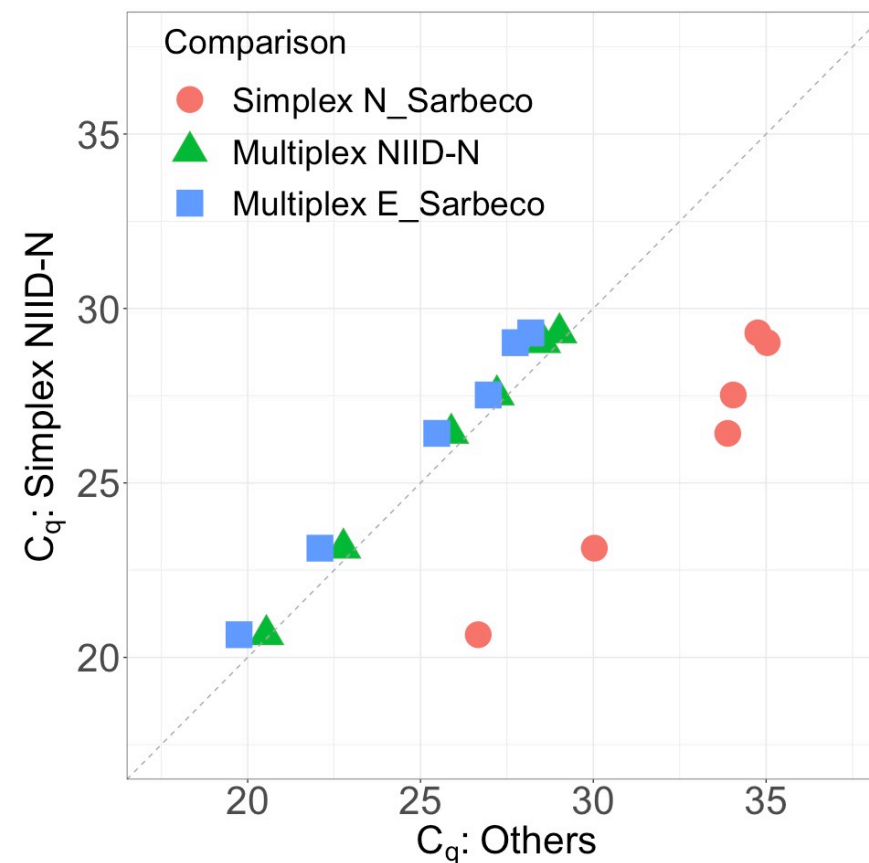
感染研のマニュアルでは、

1. Nセットの感度が低い

- 低ウィルス量の場合に、本当に陽性なのか不安であった。

2. 内部標準遺伝子を含まない

- 陰性であった場合に、本当に陰性で良いのか不安であった。



千葉大病院でのRT-PCRの最適化

検査方法の最適化に際して、WHOガイダンスの下記の記述を参考にした。

陽性結果について

- A positive NAAT result for **at least two different targets** on the COVID-19 virus genome, ...

陰性結果について（その主な要因）

- poor quality of the specimen, containing little patient material (**as a control, consider determining whether there is adequate human DNA in the sample by including a human target in the PCR testing**).
- the specimen was collected late or very early in the infection.
- the specimen was not handled and shipped appropriately.

Laboratory testing for coronavirus disease
(COVID-19) in suspected human cases

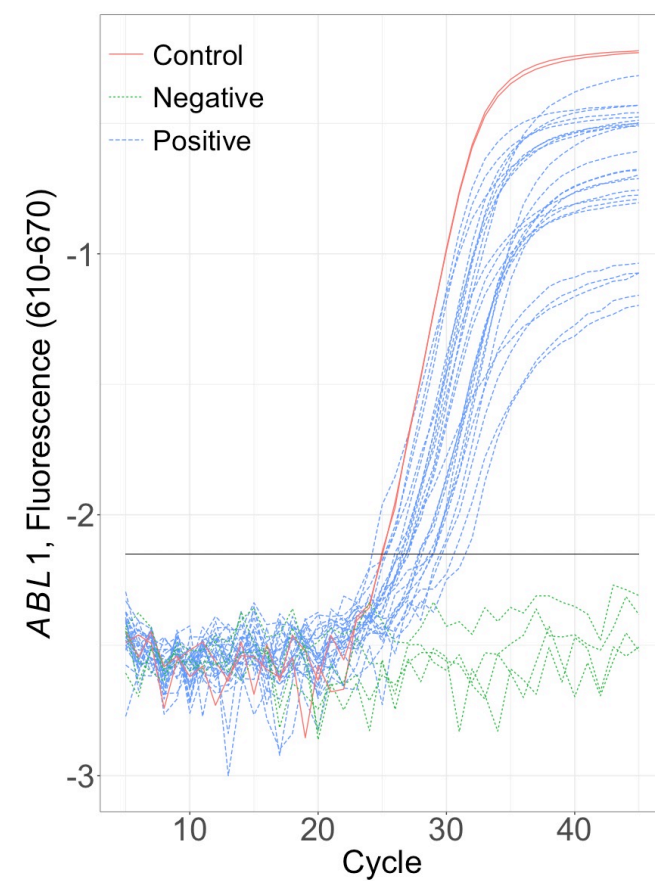
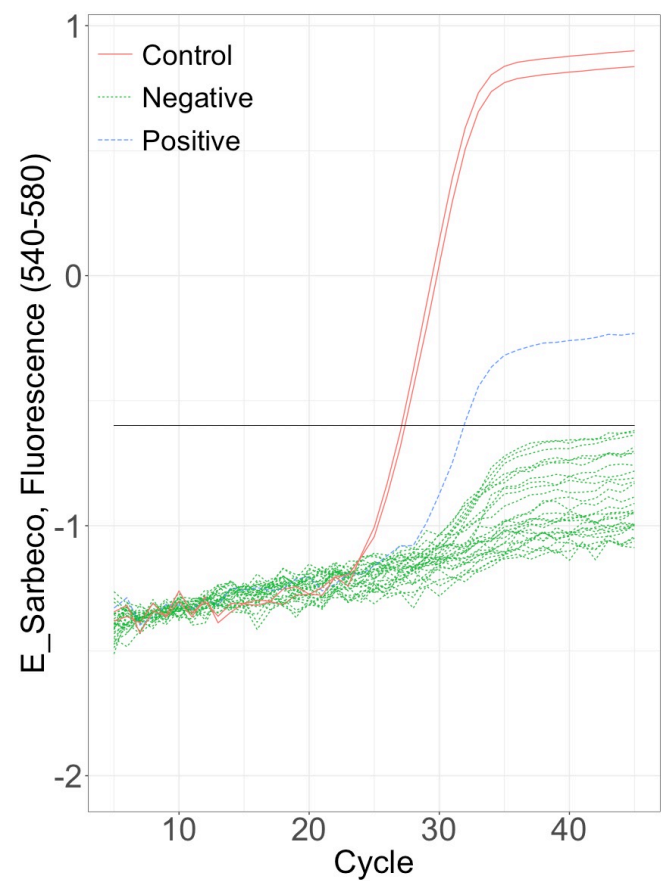
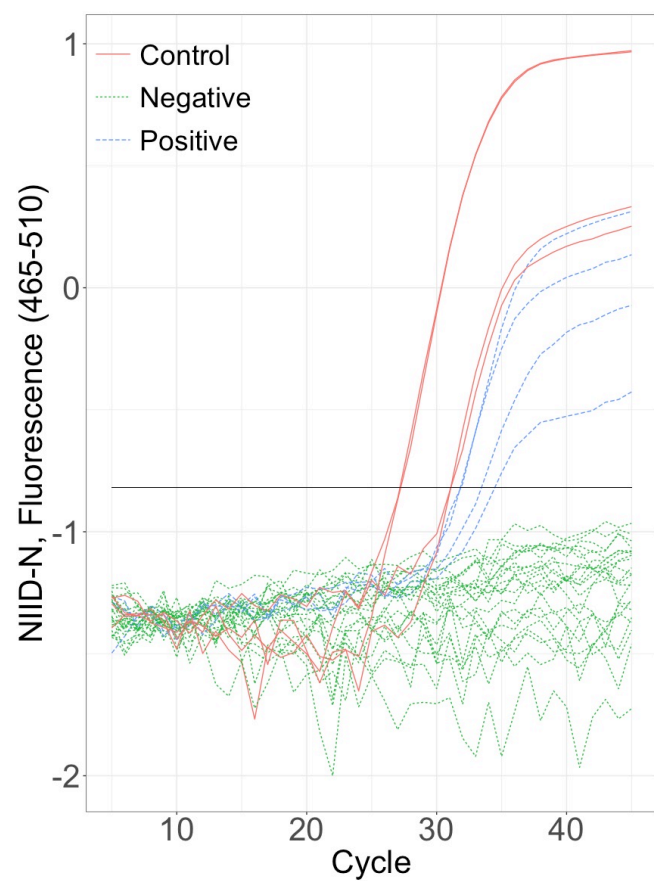
Interim guidance
19 March 2020



千葉大病院でのRT-PCRの最適化

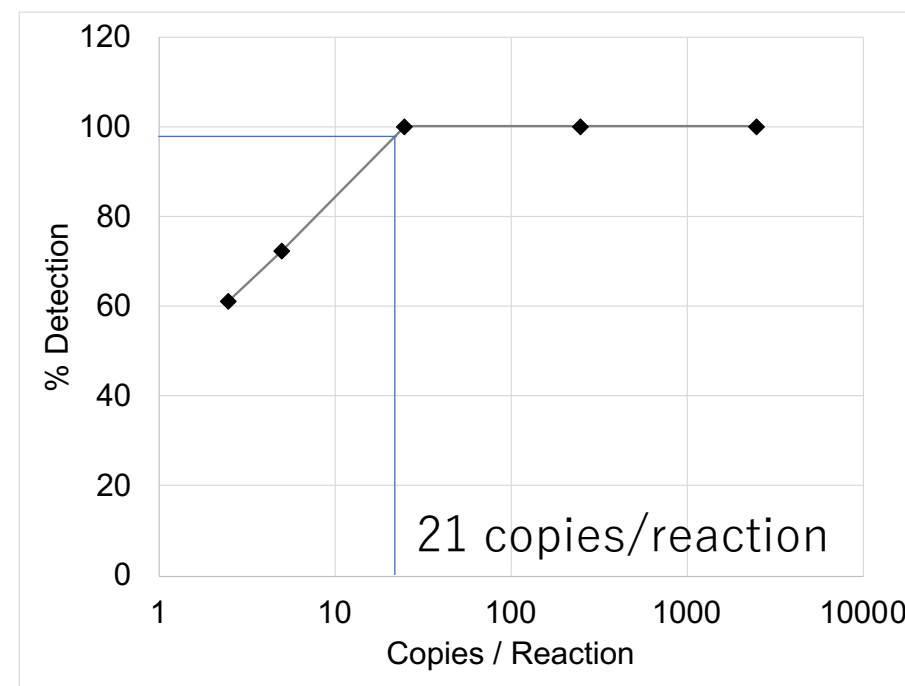
- Nセットの代わりにE遺伝子のプライマーを使用
 - 2領域の検査感度を同等にする為
- 内部標準遺伝子としてヒトABL1遺伝子を使用
 - 造血器腫瘍遺伝子検査で使用していたものを応用
- Multiplex PCRで一度に3領域を検査
 - N2 (FAM), E (HEX), *ABL1* (Cy5)

千葉大病院でのRT-PCRの最適化



RT-PCRの感度

Copies/reaction	C _q : Average (SD)	Detected/tested (%)
2500	24.5 (0.13)	6/6 (100%)
250	27.8 (0.25)	12/12 (100%)
25	31.2 (0.63)	12/12 (100%)
5	33.6 (1.41)	13/18 (72%)
2.5	34.0 (1.09)	11/18 (61%)



現在の千葉大学病院の検査方法

1. 感染研マニュアルに準じた方法

- 検査開始当初より使用（現在は主に確認方法として使用）
- 核酸精製を行う為、血清や便などにも対応可能

2. ダイレクトPCR法（2019新型コロナウイルス検出試薬キット[島津]を使用）

- 入院時陰性確認検査の実施と共に導入
- 操作が容易（=遺伝子検査に慣れていない要員でも行うことが可能）
- 核酸精製が不要（=多数検体の処理に適している）
- All-in-oneの試薬（=在庫管理がしやすい）

千葉大学病院の検査体制

検査要員

- 遺伝子検査室 4 名 + 応援4名（SARS-CoV-2のみ）

結果報告時間

- 11時までの提出検体・・・15時頃報告
- 15時までの提出検体・・・19時頃報告
- 休日（日曜日または連休最終日）にPCR検査を実施

休日入院患者に対するPCR検査フロー

少ない要員で効率的な業務を行うための協力依頼

- ・検体提出は15時まで、時間厳守をお願いします。
- ・検査オーダーの不備にご注意ください。
- ・電話による検体が提出されているか等の問い合わせを減らしてください。

実施日： 日曜日（または連休の最終日）

検査フロー

鼻咽腔ぬぐい検体採取

※指定の綿棒と輸送容器を使用して下さい。（鼻咽腔ぬぐい液以外は受付不可）



検査部緊急検査室へ検体提出（時間厳守）

※15時に検査開始のため検体提出は時間厳守をお願いします。



→→→→→ 15時以降受付分は翌日以降に検査



15時までの受付分はおおよそ19時頃に結果報告

結果報告について

陽 性： 検査部から感染症科・当該診療科へ電話連絡します。

判定保留： 精査を行う必要がある為、後日報告となります（陽性扱い）。

検出せず： 電子カルテのみの報告となります。

内部精度管理（陽性コントロールについて）

日常の精度管理には臨床検体に近いものを使用

✓試薬： Accuplex SARS-CoV-2 (Seracare社)

✓濃度： 5000 cp/mL = 25 cp/5 uL (=/well)

検査工程	合成DNA	合成RNA	擬似ウイルス
核酸抽出	No	No	yes
逆転写	No	yes	yes
PCR	yes	yes	yes

内部精度管理（陽性コントロールについて）

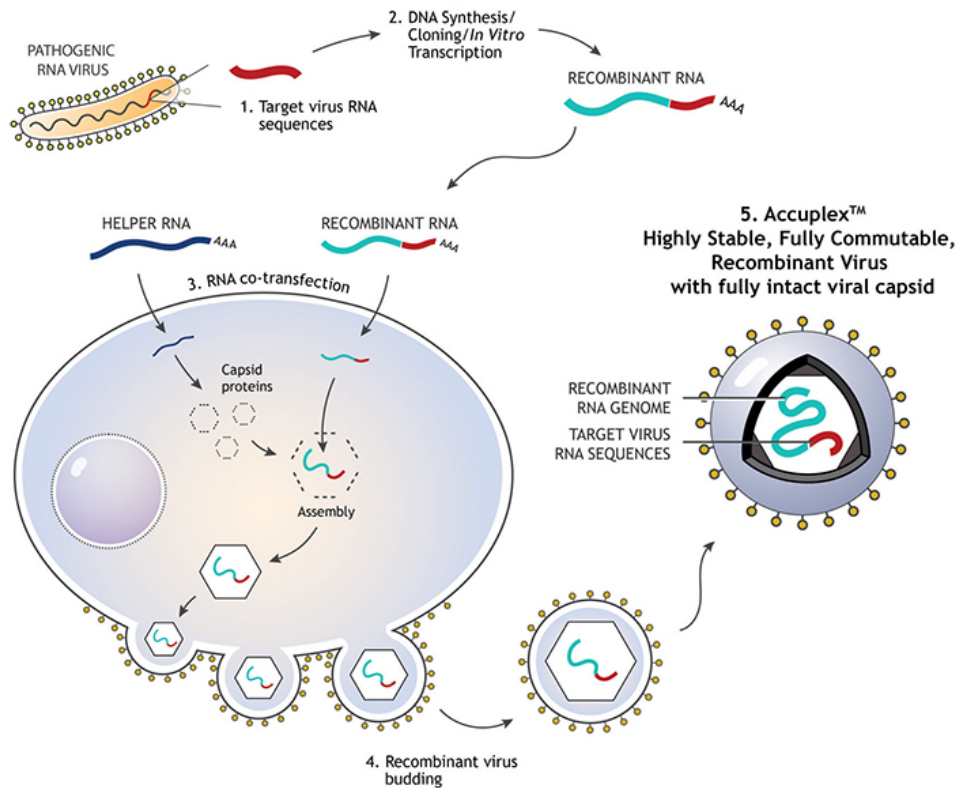
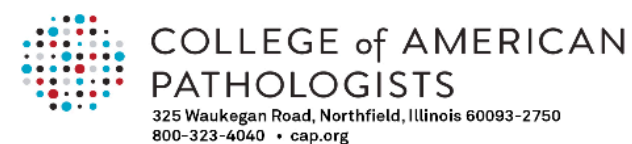


FIGURE 1:

1. RNA sequence from the pathogenic virus of interest is chosen.
2. DNA synthesis and cloning occur to produce the recombinant RNA.
3. Recombinant RNA and helper RNA are co-transfected into the mammalian cells, allowing the encapsulation of recombined RNA.
4. Exocytosis of the mature enveloped non-infectious and replication deficient RNA virus containing the assay target RNA sequence of interest

外部精度評価 (CAPサーベイの受審)



CAP Number: 3642801-01 **Kit#** 1
Institution: Chiba University Hospital
Attention: Takayuki Ishige PhD
City / State: Chiba-Shi Chi JP 260-8677

Kit ID: 33705321
Kit Mailed: 5/18/2020
Original Evaluation: 7/2/2020

Table 1. Summary of Participant Responses

Identification	Participants	
	No.	%
Not Detected (Negative)	27	1.8
Detected (Positive)	1427	96.3
Presumptive Positive	13	0.9
Indeterminate	12	0.8
Invalid	3	0.2

Not Detected (Negative)	1453	98.1
Detected (Positive)	5	0.3
Presumptive Positive	1	0.1
Indeterminate	13	0.9
Invalid	9	0.6

Not Detected (Negative)	21	1.4
Detected (Positive)	1435	96.8
Presumptive Positive	13	0.9
Indeterminate	10	0.7
Invalid	3	0.2

EVALUATION ORIGINAL

COV2-A 2020 SARS-CoV-2, Molecular

Test	Method	Specimen	Your Result	Intended Response
SARS-CoV-2	LAB DEVELOPED TEST	COV2-01	DETECTED (POSITIVE)	
		COV2-02	NOT DETECTED (NEGATIVE)	
		COV2-03	DETECTED (POSITIVE)	

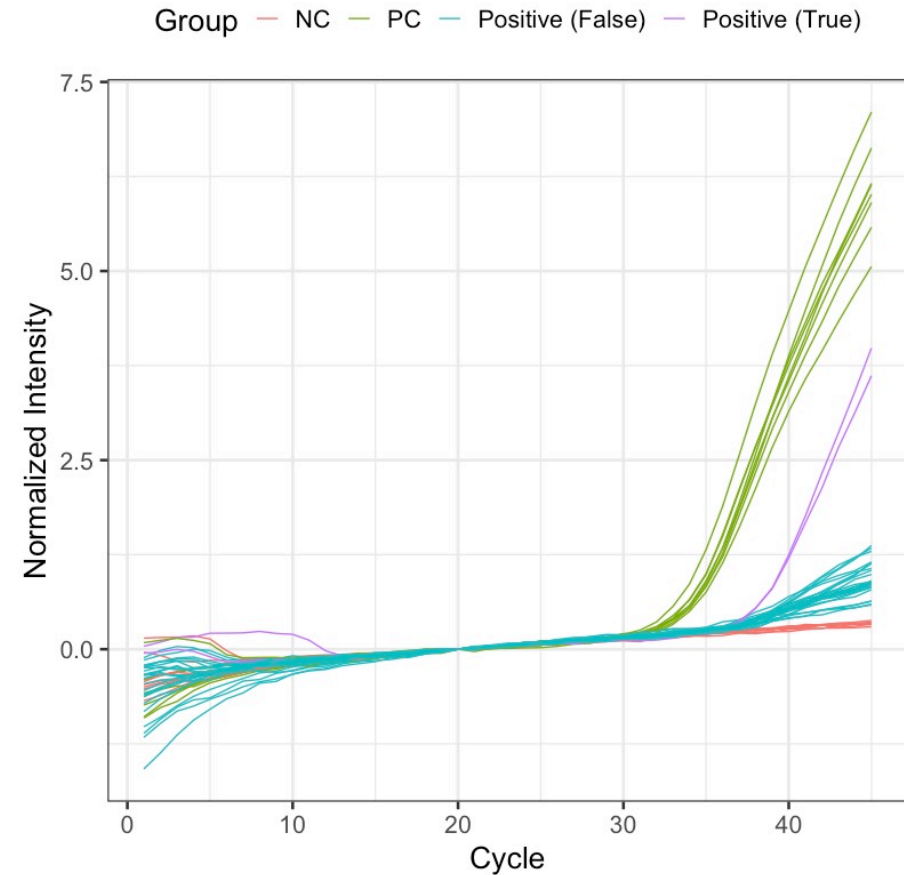
検査開始に際して良かった点

- 汎用の核酸抽出装置・リアルタイムPCR装置を持っていた。
- 造血器腫瘍の遺伝子検査を行っていた為、検査の立ち上げに必要な試薬が揃っていた。

(One-Step RT-PCR試薬、内部標準遺伝子のプライマーなど)

これまでに経験した問題点

1. 核酸精製試薬の納期遅延
2. 判定に苦慮するシグナル
 - ✓再検では陰性化する。
 - ✓40サイクル前後からシグナルが上がるが指数曲線ではない。



今後の課題

インフルエンザとの同時検査

米国CDCからはマニュアルが出ており、プライマーも併せて公開されている。

1. Inf-A [FAM]
2. Inf-B [YakimaYellow]
3. SC2 [Texas Red]
4. RP [Cy5]

CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) Multiplex Assay

For Emergency Use Only

Instructions for Use

**Catalog # Flu SC2-EUA
500 reactions**

For In Vitro Diagnostic (IVD) Use

Rx Only

Centers for Disease Control and Prevention
Influenza Division
1600 Clifton Rd NE
Atlanta GA 30329-4027

