

SmartAmp®新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出試薬キット

【重要な基本的注意】

1. 本品で判定が陰性であっても、SARS-CoV-2 感染を否定するものではありません。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果とあわせて厚生労働省の最新の症例定義を参照し、総合的に判断してください。
3. 検体採取、取扱いの際には必要なバイオハザード対策を講じてください。
4. 検査に用いる検体については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」を参照してください。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用しないでください。SARS-CoV-2 検出の臨床診断を目的とした検査にのみ使用してください。
2. 本品の使用にあたり、本添付文書記載の使用目的及び使用方法以外の方法については、測定結果の信頼性を保証いたしかねます。
3. 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありうるので、本品の使用に当たっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。
4. 測定に使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等 (キットの構成)】

1. nCoV P : 96 µL × 1 本 (24 反応分)
SARS-CoV-2 プライマー※1 TP (TP と略)
SARS-CoV-2 プライマー※1 FP (FP と略)
SARS-CoV-2 プライマー※1 iBP (iBP と略)
SARS-CoV-2 プライマー※1 oBP (oBP と略)
SARS-CoV-2 プライマー※1 tOP (tOP と略)
SARS-CoV-2 プライマー※1 fOP (fOP と略)
SARS-CoV-2 Eprimer※2 oBPEX (oBPEX と略)
2. nCoV E : 48 µL × 3 本 (8 反応分 × 3 本)
デオキシアデノシン 5'-3' リン酸 (dATP と略)
デオキシチジン 5'-3' リン酸 (dCTP と略)
デオキシグアノシン 5'-3' リン酸 (dGTP と略)
デオキシチミジン 5'-3' リン酸 (dTTP と略)
硫酸マグネシウム
鎖置換型 DNA 合成酵素※3 (Aac DNA pol と略)
逆転写酵素※4 (RT と略)
3. 陽性コントロール nCoV※5 : 100 µL × 1 本 (10 反応分)
(SARS-CoV-2 RNA としておよそ 1×10^5 コピー/テスト含有)※6
4. 陰性コントロール : 100 µL × 1 本 (10 反応分)

※1: SARS-CoV-2 の Nsp15 領域内に設定したプライマーで、合成オリゴヌクレオチドを精製したものを。

※2: SARS-CoV-2 の Nsp15 領域内に設定した Eprimer で、有機合成した Eprimer を精製したものを。

※3: *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来の DNA Polymerase I から 5'-3' exonuclease 活性を除いた鎖置換型 DNA 合成酵素。

※4: Avian Myeloblastosis Virus 由来の逆転写酵素。

※5: 陽性コントロール nCoV は、SARS-CoV-2 の Nsp15 領域の塩基配列を化学合成した DNA を鋳型として試験管内転写反応により得た RNA。

※6: 出荷調製時の含有量。ただし、輸送等により力価が落ちることがあります。

【使用目的】

生体試料中の SARS-CoV-2 RNA の検出 (SARS-CoV-2 感染の診断の補助)

【使用目的に関連する使用上の注意】

【臨床的意義】、【操作上の注意】の内容を熟知し、本品の有用性を理解した上で、検体種を選択してください。

【測定原理】

本品は株式会社ダナフォームと国立研究開発法人理化学研究所の共同研究の成果により、取得した特許である SmartAmp (Smart Amplification Process) 法¹⁾ および Eprimer を用いた蛍光検出法を測定原理とした等温核酸増幅技術²⁾ で、生体試料中の SARS-CoV-2 の遺伝子を特異的に検出できる試薬です。SmartAmp 法は、①遺伝子増幅反応が等温で短時間に進行する、②7 本のプライマーセットで 7 領域を認識するため特異性が高い、③蛍光物質である Eprimer を使用しているため特異性が高い蛍光検出ができる等の特徴を有した方法です³⁾。

本品は、SARS-CoV-2 ゲノム RNA の Nsp15 領域内にプライマーを設計しています。この領域は SARS-CoV-2 の分離株間で保存されており、かつ他の 6 種のコロナウイルスに対しアライメント解析を行った結果、高い選択性を確保できると推定できる領域であります。

本品は、市販の RNA 抽出試薬などを用いて精製した RNA 試料を検出対象とします。この RNA 試料と SARS-CoV-2 プライマー、SARS-CoV-2 Eprimer oBPEX、デオキシアデノシン 5'-3' リン酸、デオキシチジン 5'-3' リン酸、デオキシグアノシン 5'-3' リン酸、デオキシチミジン 5'-3' リン酸、硫酸マグネシウム、鎖置換型 DNA 合成酵素、逆転写酵素等を混合し反応させると、この反応溶液中の RNA は逆転写酵素の作用により cDNA が合成されます。この cDNA が SARS-CoV-2 由来の核酸配列を有すると特異的プライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素により核酸増幅反応が起こります。

SARS-CoV-2 由来の核酸増幅の検出は、Eprimer による蛍光を検出することにより行います。Eprimer は一本鎖の状態では蛍光を発しませんが、相補的な配列と 2 本鎖を形成することにより蛍光を発します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取

採取した患者検体は感染の危険性があるので、必要なバイオハザード対策を実施してください。検体採取、検体の取扱い場所及び取扱う際の装備等については、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」、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」を参照してください。

2. 妨害物質・妨害薬剤・交差反応性

1) 共存物質の影響

生体中に存在する以下の物質は表示した濃度まで測定には影響はないことを確認しています。

表 1：共存物質と使用濃度

	共存物質	濃度(1テスト中)
ヒト組織由来	遊離型ビリルビン	195 mg/dL
	抱合型ビリルビン	197 mg/dL
	乳び	16,100 度
	溶血ヘモグロビン	5,000 mg/dL
	唾液	2 倍希釈
	ムチン	50 mg/mL
薬剤	ヒト血	21 µL/mL
	ミノサイクリン	5 mg/mL
	エリスロマイシン	5 mg/mL
	ザナミビル	93 mg/mL
	オセルタミビル	5 mg/mL

2) 交差反応性

SmartAmp®新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出試薬キットの in vitro レベルの交差反応性として、各種ウイルス、細菌の DNA または RNA を鋳型として増幅が認められるかを評価しました。被験株の核酸は市販品を入手し試験に用いました。いずれも【用法・用量(操作方法)】に従い、3 well 反応させ、40 サイクル以内に増幅が認められるか否かを確認しました。その結果、いずれも増幅は認められず交差反応性無しと判定されました(下記表 2 参照)。

表 2：交差反応性の in vitro 検討の結果

Strain	用量	結果 (1 回目、2 回目、3 回目)	判定
Human coronavirus 229E	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human coronavirus HKU1	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human coronavirus NL63	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human coronavirus OC43	90,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
SARS coronavirus	62,500 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
MERS coronavirus	75,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human adenovirus, type 1	150,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human enterovirus	70,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human parechovirus 1	95,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Human herpesvirus	110,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Influenza A (H1N1)	90,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Influenza A (H3N2)	75,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Influenza B	65,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Parainfluenza virus 1	80,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Parainfluenza virus 2	62,500 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Parainfluenza virus 3	90,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし

Respiratory syncytial virus	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Bordetella pertussis	200,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Candida albicans	200,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Chlamydia pneumoniae	190,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Corynebacterium diphtheriae	500 (ng/test)	—/—/—	交差反応性なし
Haemophilus influenzae	140,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Legionella pneumophila	140,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Moraxella catarrhalis	140,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Mycobacterium tuberculosis	140,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Mycoplasma pneumoniae	170,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Neisseria elongata	500 (ng/test)	—/—/—	交差反応性なし
Pseudomonas aeruginosa	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Staphylococcus aureus	120,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Staphylococcus epidermidis	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Streptococcus pneumoniae	150,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Streptococcus pyogenes	1,000,000 (copies/test)	—/—/—	交差反応性なし
Streptococcus salivarius	500 (ng/test)	—/—/—	交差反応性なし

【用法・用量(操作方法)】

1. 必要な器具・器材・試料等

- (1) ウイルス RNA 抽出精製キット
- (2) マイクロピペット
- (3) フィルター付きチップ
- (4) クーラーラック及び氷 (クラッシュアイス)
- (5) 遠心機
- (6) ボルテックスミキサー、プレートミキサー
- (7) マイクロチューブ (RNase/DNase フリー)
- (8) PCR 用プレートもしくは 8 連 PCR 用チューブ
- (9) プレートシールもしくは 8 連チューブキャップ
- (10) リアルタイム PCR 装置
推奨フィルター：FAM、SYBR Green
測定波長：510～530 nm

2. RNA 試料および反応溶液の調製方法

(1) RNA 試料の調製

検体から精製した RNA 試料を使用します。試料の調製については、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」に従ってください。

(2) 反応溶液の調製

- (i) 冷凍庫から陽性コントロール nCoV、陰性コントロール、nCov E、nCov P を検査に必要なテスト数のみ取り出し、溶液を室温で解凍し、氷上に置いてください※7。
- (ii) チューブで 10 µL の RNA 試料と 4 µL の nCoV P を混合します(図 1 ①)。RNA 試料が 10 µL に満たない場合には、滅菌水で 10 µL にメスアップしてください。なお、コントロール反応用に、RNA 試料の代わりに陽性コントロール nCoV 10 µL を添加した陽性混合液と、陰性コントロール 10 µL を添加した陰性混合液をそれぞれ調製してください。
- (iii) 氷上で PCR 用プレートもしくは 8 連 PCR 用チューブに 6 µL の nCoV E を分注します。PCR 機器とプレートの組み

合わせによっては偽陽性が発生しやすいものがありますので、使用可能なプレートおよびチューブについては弊社までお問い合わせください。

(iv) 調製液 (iii) で混合した 14 μL を、氷上で分注済みの nCoV E に加えます。混合液を 10 回ほどピペティングし、反応溶液を調製してください (図 1 ②)。

※7: 溶解後は氷上で静置し、できるだけ速やかに使用してください。また、陽性コントロール nCoV は凍結融解によって徐々に劣化するため、使用時以外の凍結融解は避けてください。

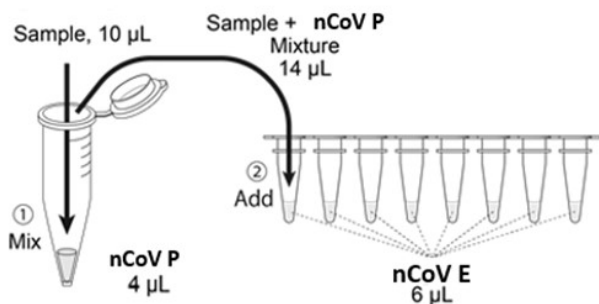


図 1. サンプルの調製

<測定にあたっての注意>

(1) SmartAmp 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の核酸がごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす恐れがあります。このようなコンタミネーションを回避するために、生体試料の不活化処理から核酸精製までの工程と反応試薬の調製の工程は別々のクリーンベンチ等を使用して行ってください。なお、電気泳動等での増幅産物の取扱いは避けてください。

(2) RNA 分子は不安定なため、取扱いには注意が必要です。特に RNA 分解酵素 (RNase) により容易に分解されてしまいます。RNase は検査器具、試薬、水だけでなく、材料である検体や組織等、さらには検査従事者自身の唾液や汗からも混入する恐れがあるうえ、熱に強くオートクレーブ処理でも完全に失活させることができません。このため極力 RNase が混入することを防ぐことが重要であり、そのために以下の注意が必要となります。

- ・ RNA 検査を行う検査台や検査器具を他と区別してください。
- ・ 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの RNase の混入を防いでください。

(3) 検出試薬を使用する際には、一旦スピンドウンしてチューブの壁やキャップに付着している試薬を落とした後、十分混合し再度スピンドウンしてから使用してください。検出試薬キットと処理済みサンプルを混和後、反応液に気泡が残っていると蛍光測定の支障となり誤判定の原因となる場合がありますので、なるべく気泡が生じないように注意してください。気泡が残っている場合には、スピンドウンして取り除いてください。

(4) SmartAmp 反応後のチューブは決して開けないでください。特に反応試薬を装置から取り出すときにチューブのキャップが誤って開かないよう慎重に取り出してください。検体の増幅産物によるコンタミネーションは誤判定の原因となるばかりでなく、検査環境そのものを汚染し、汚染を除去しない限り、以後の検査で正しい結果が得られなくなる恐れがあります。

【測定結果の判定法】

装置による判定

1. 検査の正確性を担保するために陽性コントロールにおいて増幅が 40 サイクル以内に検出されること、陰性コントロールにおいて 40 サイクルまで増幅していないことを確認します。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない

可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施する必要があります。

2. 各検体の判定: 縦軸を蛍光強度の変化量 (ΔR [または ΔR_n] で示される値) に設定します。

(1) 陽性コントロールの増幅結果を用いて、 ΔR の最大値 (Max 値) を測定し、最大値の 1/10 値を、閾値 (Threshold 値) として設定します。

(2) 検体に対する蛍光測定結果において、40 サイクル以内に閾値を超えた増幅が認められた場合を「陽性」と判定します。検出サイクル数 (Ct 値) を求める場合は、閾値を超えた値とします。

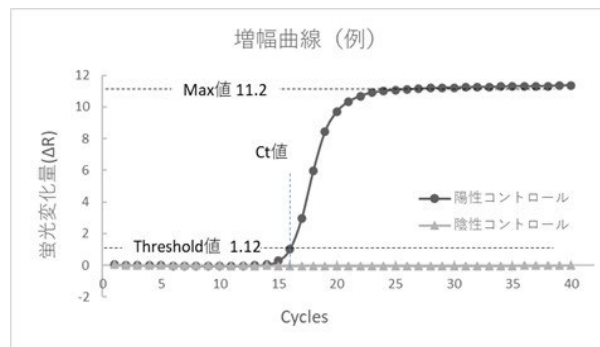


図 2. 増幅曲線パターン

<判定上の注意>

本品の最小検出感度は 50 コピー/テストとなっています。本品で陰性と判定されても、SARS-CoV-2 の感染を否定できるものではありません。また、判定の結果が陰性であっても、症状が持続し SARS-CoV-2 感染が否定できない状況では再度検査を実施する必要があります。

なお、検体によって蛍光強度上昇開始時間や上昇値が陽性コントロールと異なる場合があります。増幅曲線が陽性コントロールと類似する曲線になっていない場合は再測定をしてください。

測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果とあわせて厚生労働省の最新の症例定義を参照し、総合的に判断してください。

【臨床的意義】

中国から感染が広がっている新型コロナウイルスについて、世界保健機関 (WHO) は 2020 年 1 月 30 日、「世界的な緊急事態」を宣言しました。この新型コロナウイルスは国際ウイルス分類委員会において「SARS-CoV-2」と命名されました。この SARS-CoV-2 によるウイルス性呼吸器疾患は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) として世界各地に急速に増加し、多くの患者と死者を出しました。2023 年 5 月に WHO より事実上の宣言終了が発表されましたが、依然としてウイルスの変異は続いており、変異ウイルスの監視体制を強めるなど、引き続き警戒が必要であることから、核酸検出法の確立による検査体制の拡充は喫緊の課題であります。

現在、新型コロナウイルスの検出は、ウイルス RNA 検出を原理とするリアルタイム PCR 法が主流となっています。今回、神奈川県衛生検査所と理化学研究所が共同で開発した SmartAmp 法は、リアルタイム PCR 装置を用いるものの、温度の上げ下げの必要が無く、一定温度による、より単純な工程で迅速かつ高感度で SARS-CoV-2 RNA の検出が可能です。本品を用いた SARS-CoV-2 の検出は、SARS-CoV-2 感染の診断の補助に有用です。

<臨床性能試験成績>

医療機関より収集した臨床検体を用いて、本品と国立感染症研究所 N2 法 (RT-PCR) の検査結果を比較しました。

本品と RT-PCR の一致率の比較 (唾液)

	RT-PCR		計
	陽性	陰性	

本品	陽性	51	5	56
	陰性	3	83	86
計		54	88	142
陰性一致率		94%	(83/ 88)	
陽性一致率		94%	(51/ 54)	
全体一致率		94%	(134/142)	

本品と RT-PCR の一致率の比較（鼻咽頭ぬぐい液-1）

		RT-PCR		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	27	1	28
	陰性	4	9	13
計		31	10	41
陰性一致率		90%	(9/10)	
陽性一致率		87%	(27/31)	
全体一致率		88%	(36/41)	

本品と RT-PCR の一致率の比較（鼻咽頭ぬぐい液-2）

		RT-PCR		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	41	0	41
	陰性	5	58	63
計		46	58	104
陰性一致率		100%	(58/ 58)	
陽性一致率		89%	(41/ 46)	
全体一致率		95%	(99/104)	

本品と RT-PCR の一致率の比較（鼻腔ぬぐい液）

		RT-PCR		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	87	1	88
	陰性	8	59	67
計		95	60	155
陰性一致率		98%	(59/ 60)	
陽性一致率		92%	(87/ 95)	
全体一致率		94%	(146/155)	

不一致例の考察

リアルタイム RT-PCR (N2) との不一致例の多くは、RT-PCR での定量値と Ct 値、SmartAmp 法の Ct 値から、コピー数の低い検体と推定されました。

【性能】

1. 感度試験

陰性管理検体（濃度 0 コピー／テスト）、陽性管理検体 1（濃度 1×10^5 コピー／テスト）を所定の操作で試験するとき、陰性又は陽性の反応を示します。

2. 正確性試験

陰性管理検体（濃度 0 コピー／テスト）、陽性管理検体 2（濃度 1×10^2 コピー／テスト）を所定の操作で試験するとき、陰性管理検体は陰性に、陽性管理検体 2 は陽性に判定されます。

3. 同時再現性試験

陰性管理検体（濃度 0 コピー／テスト）、陽性管理検体 2（濃度 1×10^2 コピー／テスト）をそれぞれ 3 回所定の操作で試験するとき、陰性管理検体は陰性に、陽性管理検体 2 は陽性に判定されます。

4. 最小検出感度

50 コピー／テスト

5. 校正用基準物質に関する情報

SARS-CoV-2 の Nsp15 領域の塩基配列を化学合成した DNA を鋳型として試験管内転写反応により得た RNA です。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

- (1) 検体は感染の危険があるものとして注意して取扱い、必要なバイオハザード対策を実施してください。
- (2) 本品が誤って目や口に入った場合、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- (1) 本品キットは必ず -70℃以下で保存し、試薬の劣化を防止するために、使用時は必要分の試薬だけを取り出して使用してください。（凍結融解の繰り返しは品質維持のため避けてください。）
- (2) 検査環境へのコンタミネーションを避けるため、陽性コントロール nCoV は本添付文書に記載の操作方法以外での使用（希釈や検体などへの添加等）は、絶対に行わないでください。
- (3) 陽性コントロール nCoV 及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して使用してください。
- (4) 本品は外箱・外袋に表示の使用期限 (Exp.date) 内に使用してください。
- (5) nCoV P は蛍光物質を含むため試薬調製時以外は遮光保存してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) SmartAmp 反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し医療廃棄物として処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。
- (2) 検体に接触した器具、試薬および試薬容器（チップ、使用後の前処理液およびカラム）は感染の危険があるものとして処理してください。
- (3) 本品に含まれる試薬チューブはポリプロピレン、キットケースはアルミを主な材質としています。廃棄の際は医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法

-70℃以下

有効期間

6 ヶ月

【包装単位】

製品名	包装単位	製品コード
SmartAmp® 新型コロナウイルス (SARS-nCoV-2) 検出試薬キット	24 テスト分	ID002

【主要文献】

主要文献

- 1.) Y. Mitani, A. Lezhava, Y. Hayashizaki, et al.: Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. Nat Methods., Mar;4(3): 257~262, 2007
- 2) A. Lezhava, T. Ishidao, Y. Hayashizaki, et al.: Exciton Primer-mediated SNP detection in SmartAmp2 reactions., Hum Mutat., Feb;31(2):208~217, 2010
- 3) S. Ikeda, A. Okamoto, : Hybridization-Sensitive On-Off DNA Probe: Application of the Exciton Coupling Effect to Effective Fluorescence Quenching. Chem. Asian J., Jun 2;3(6): 958-968, 2008

【問い合わせ先】

株式会社ダナフォーム お客様相談窓口
電話番号:045-633-1481

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

株式会社ダナフォーム

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-1-43

ライフサイエンス研究センター302 号室