

広島大学の新型コロナウイルス研究者による第1回プレスセミナー



広島大学

唾液を用いた新型コロナウイルス検査キットPCRの精度はキットで異なる

広島大学・副学長（産学連携）

広島大学・医系科学研究科・細胞分子生物学研究室 教授

創薬バイオマーカー拠点 拠点長

田原 栄俊



SARS-CoV-2

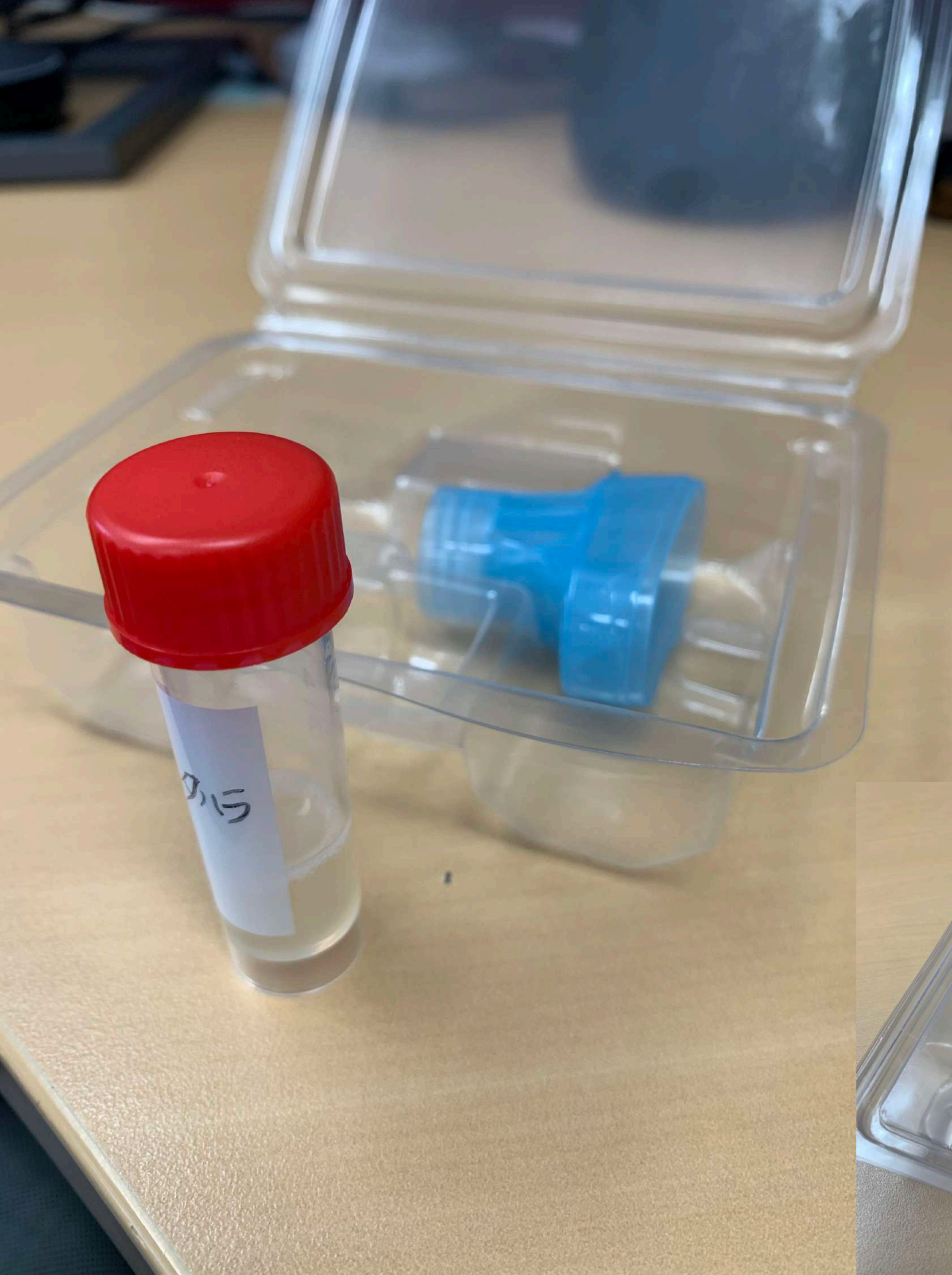
Covid-19ウイルスRNAの検出
qRT-PCR
(ダイレクトPCR検査)





唾液検査を想定した SARS-CoV-2 PCRキットの比較

- Takara Ver.2
- Shimazu Ver.2
- TOYOBO Ver.3



FESTO

開栓閉栓
ロータリー
グripper

液量検知器

液量残量
検知器

バーコード
リーダー

汚染防止
プレート

オート
ピペット

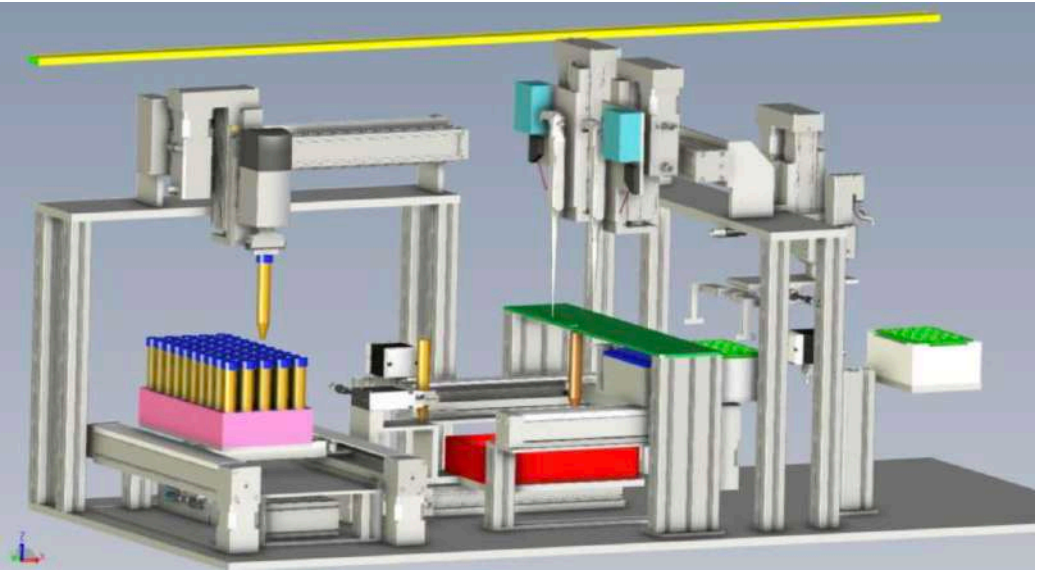
検体

チューブ固定
平行
グripper

チップ



検体前処理および PCR の過程



検体前処理自動化



ウイルス量／反応で判定

48検体

1hr



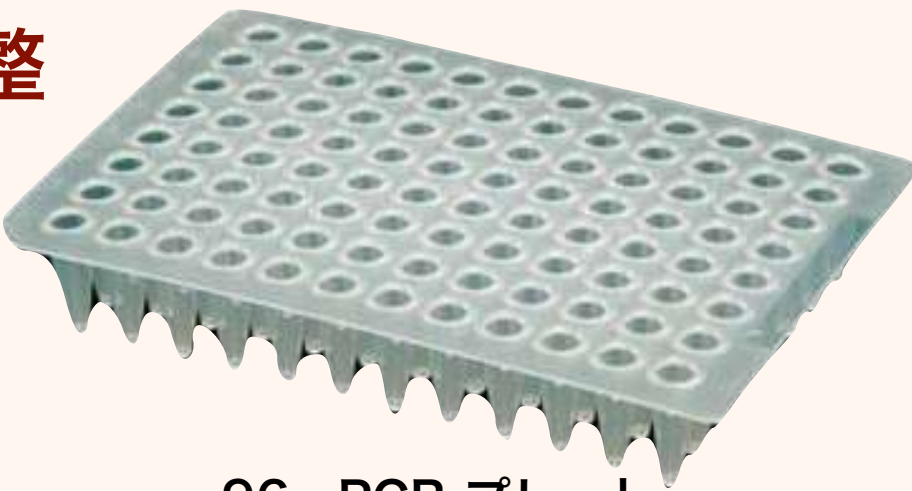
検体の不活化：A

検体の不活化



PCR反応：B

PCR反応液調整



96 PCR プレート

Direct
qRT-PCR

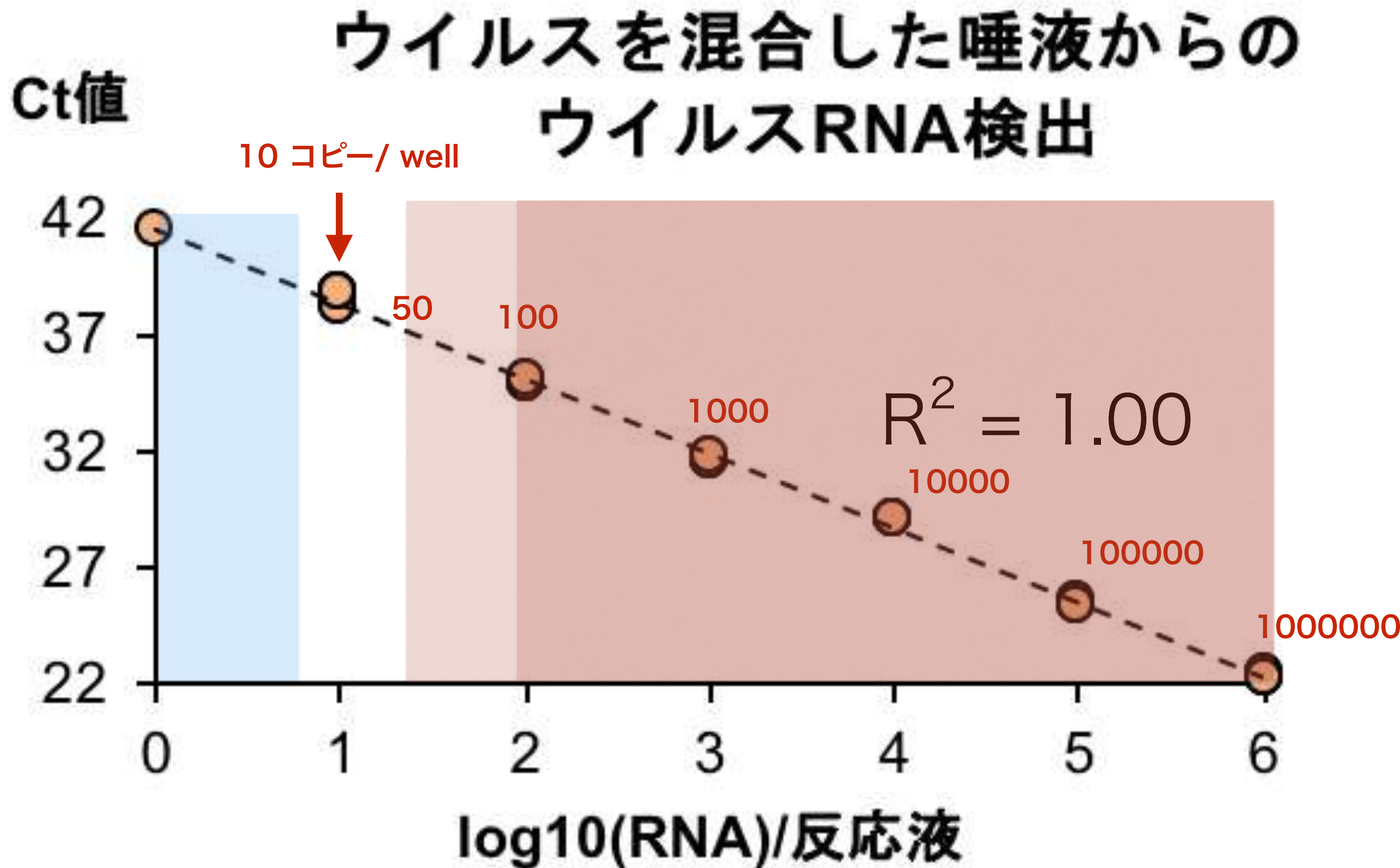


0.8hr

	A	B
	必要検体量 /1 test	最終持ち込み 検体量
Takara ver.2	16 μ L	4.8 μ L
TOYOBO ver.3	8 μ L	7.3 μ L
Shimazu ver.2	5 μ L	5 μ L

SARS-CoV-2 Direct RT qPCR

使用キット：
SARS-CoV-2 Direct Detection
RT-qPCR Kit ver. 1,
(タカラバイオ)



安定的にウイルスRNAを検出できた
唾液中ウイルス濃度：
約50,000個 / ml (暫定値)
10 コピー/ well

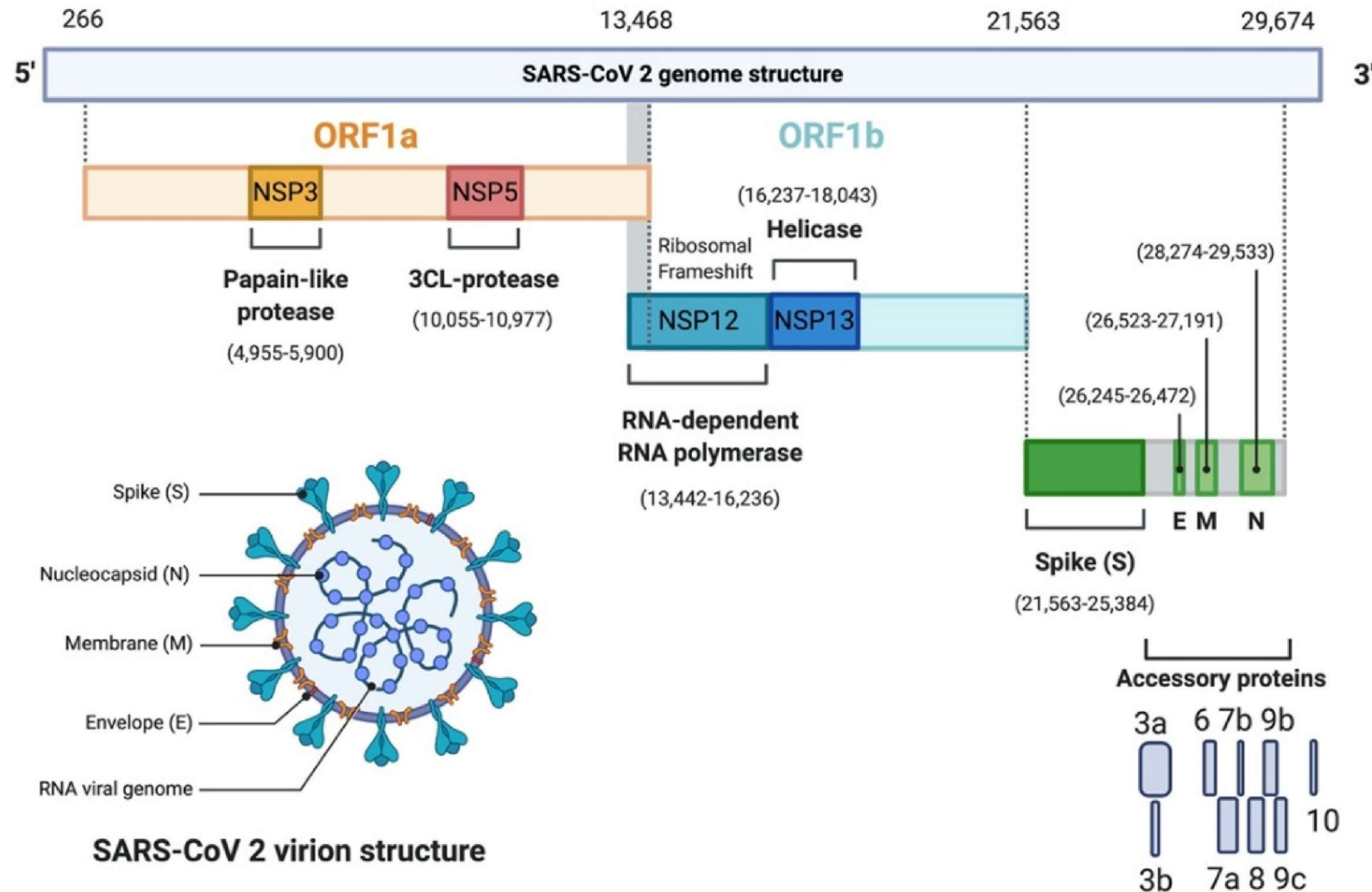
令和2年3月13日

新型コロナウイルス (2019-nCoV) の遺伝子検査法の性能評価について

一般的なウイルスRNAに対して、以下の検出感度を持つ遺伝子検査法（リアルタイムPCR、LAMP等）について、新型コロナウイルスの検出に使用する場合の臨床検体を用いた評価方法の例を示す。

逆転写及び遺伝子増幅時間	検出限界
1 時間以上	50ウイルスゲノムコピー/反応 以下
15分～1時間未満	100ウイルスゲノムコピー/反応 以下
15分未満	200ウイルスゲノムコピー/反応 以下

SARS-CoV-2 のゲノム構造とコードされるタンパク質



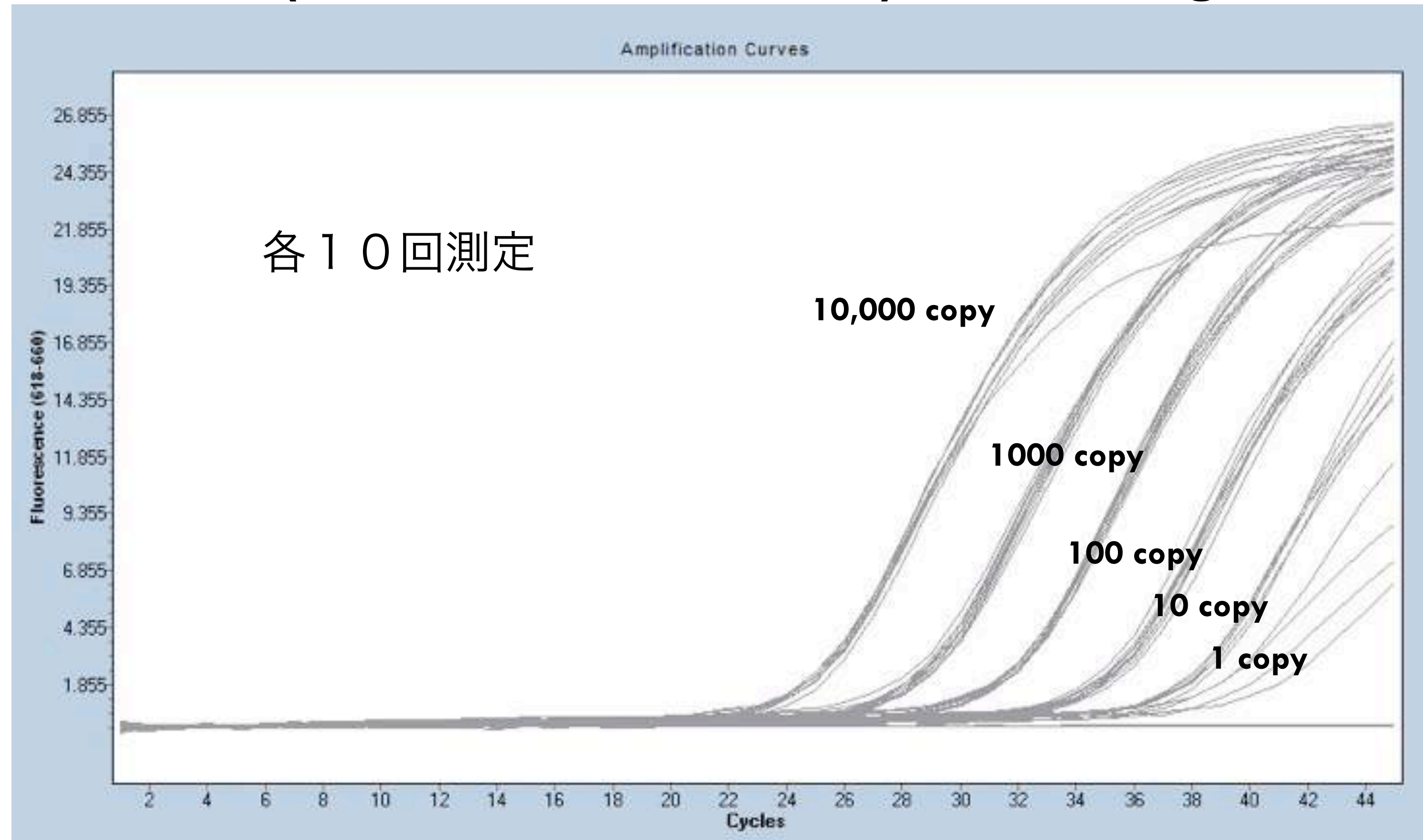
3社キットの比較

	必要検体量 /1 test	最終持ち込み 検体量 /well	逆転写反応	Primer N1 gene	Primer N2 gene	N1 geneの 蛍光プロ ーブ	N2 geneの 蛍光プロ ーブ	ICの 蛍光プロ ーブ
Takara ver.2	16 μ L	4.8 μ L	52°C(5min) →95°C(10s)	*アメリカ疾病予防管理セン ター(CDC)発行のprimer・ プローブ配列	*アメリカ疾病予防管理センター (CDC)発行のprimer・プローブ配 列	Cy5	Cy5	FAM
TOYOBO ver.3	8 μ L	7.3 μ L	42°C(5min) →95°C(10s)	*アメリカ疾病予防管理セン ター(CDC)発行のprimer・ プローブ配列	Fw:*アメリカ疾病予防管理センター (CDC)発行のprimer・プローブ配 列 Rv:**国立感染症研究 所発行配列	Cy5	ROX	FAM
Shimazu ver.2	5 μ L	5 μ L	42°C(10min) →95°C(1min)	*アメリカ疾病予防管理セン ター(CDC)発行のprimer・ プローブ配列	*アメリカ疾病予防管理センター (CDC)発行のprimer・プローブ配 列	ROX	FAM	Cy5

TAKARA Ver2の検出限界は、1コピー/ μ L

検出限界 **LOQ (Limit of Quantification) of N1・N2 gene**

Cy5 Fluorescence (618-660nm)



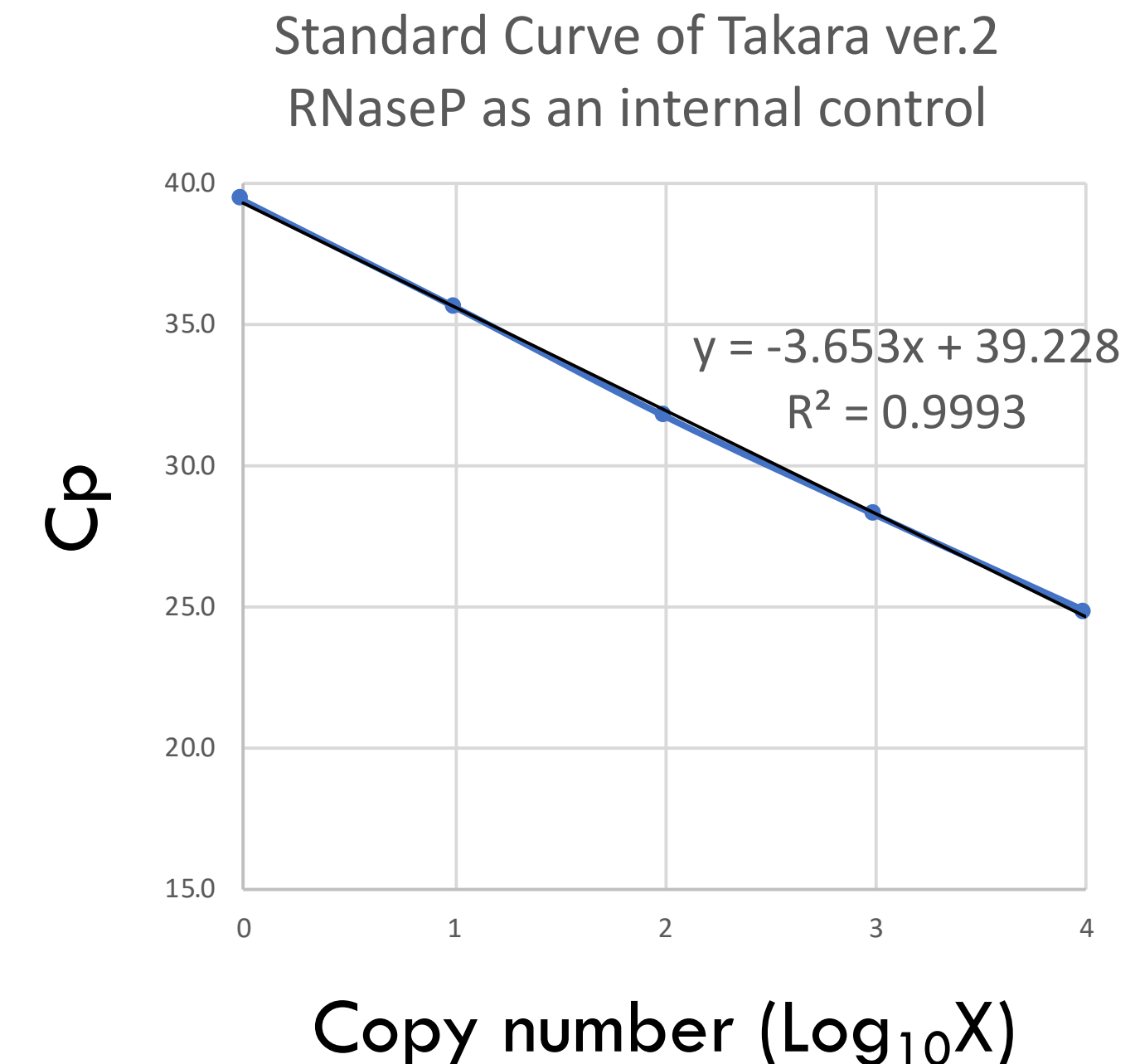
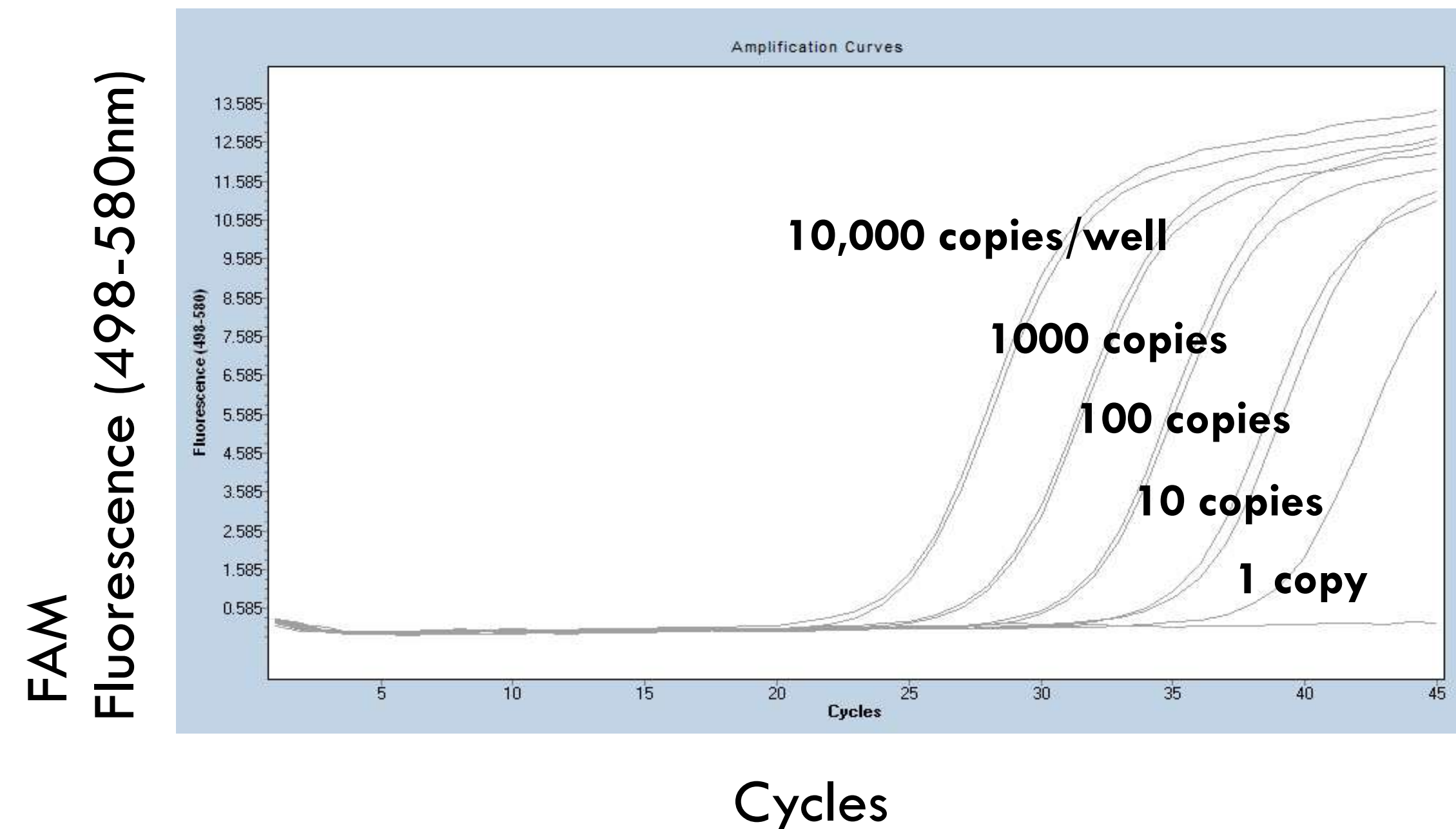
検出限界 = LOQ

TAKARA Ver.2 $\cong$ 1 copy/ μ L

検体採取の有無を確認出来る内部標準の定量性

唾液中のRNasePを用いて定量

RNaseP as an internal control



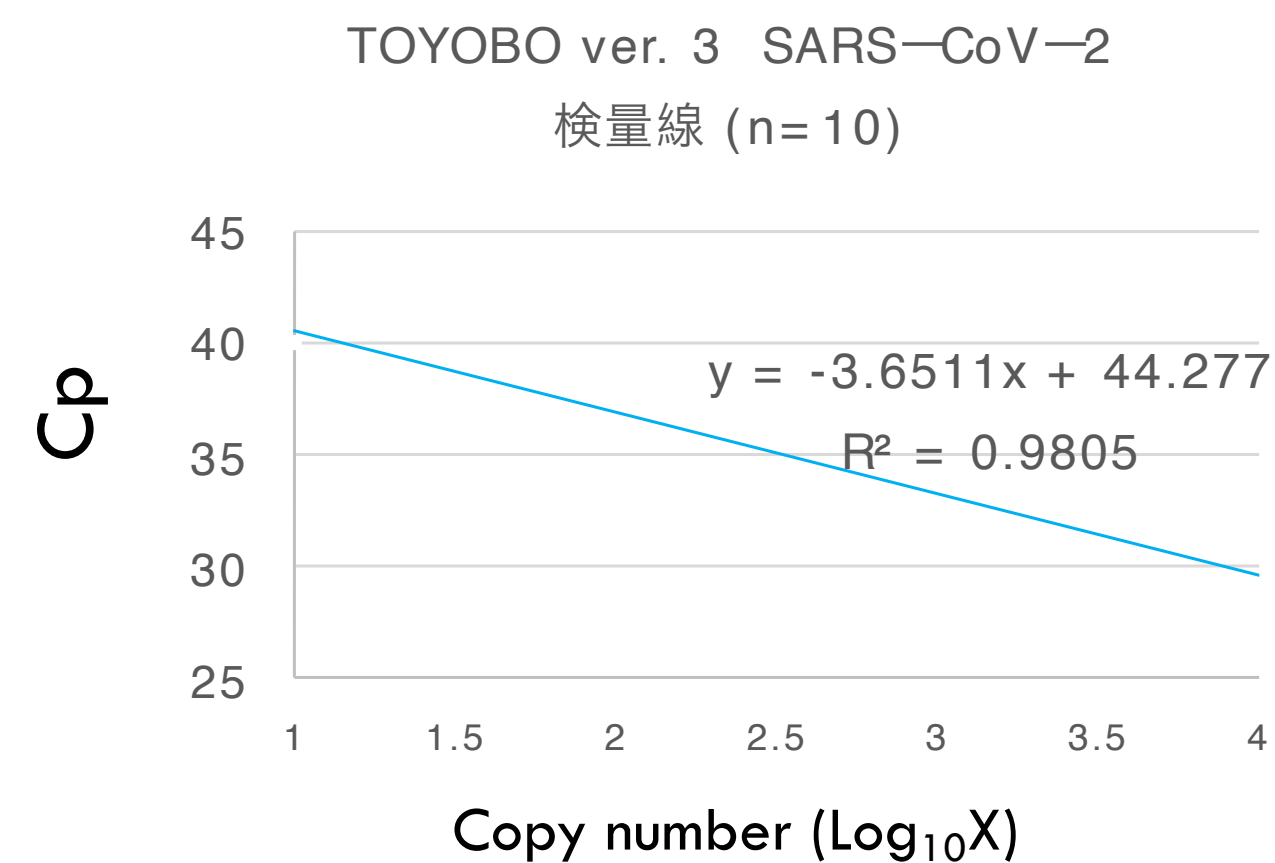
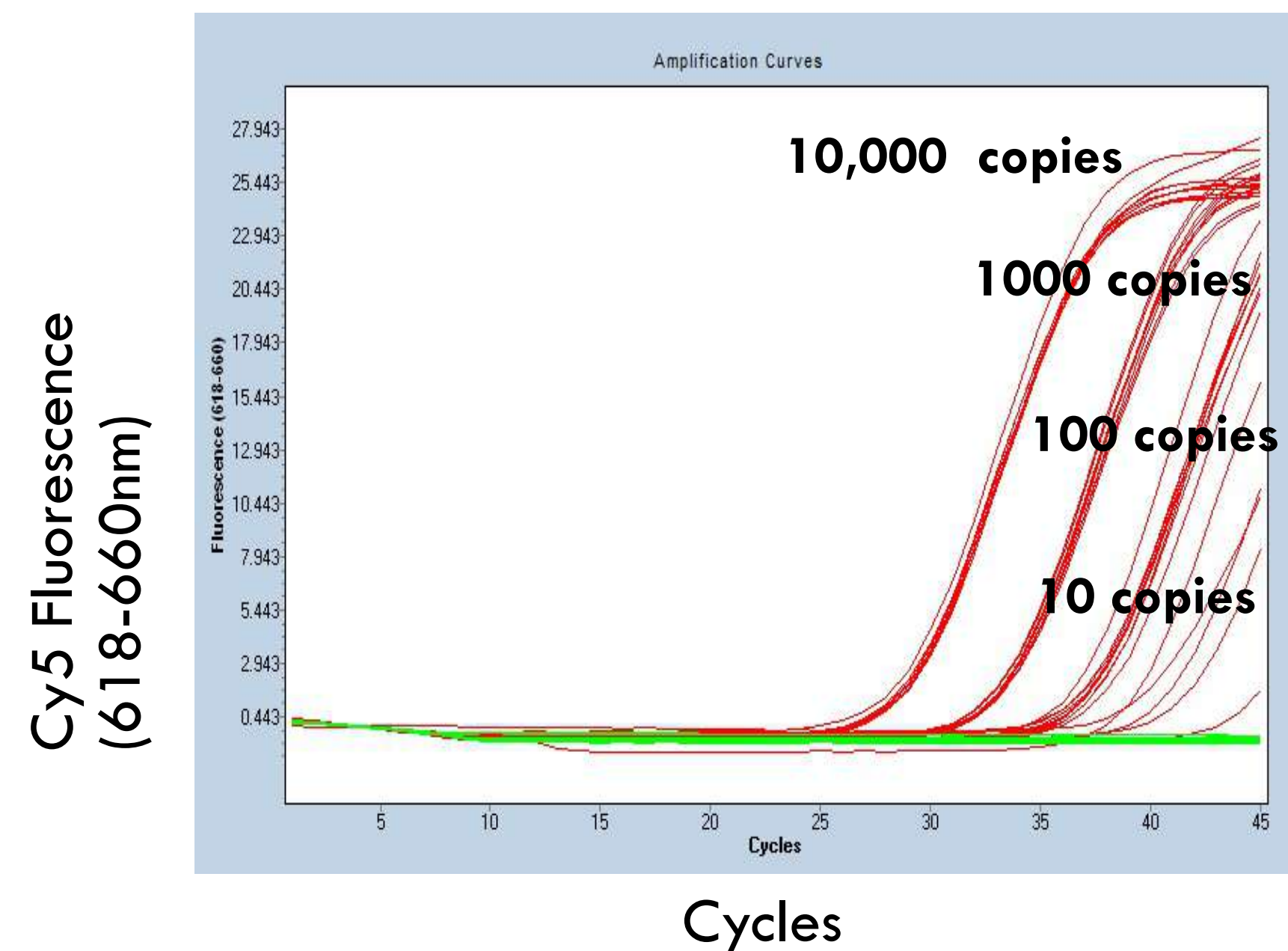
1 copy/wellまでwell間で誤差が少ないRNasePのstandard curve が引けた

検体採取の有無を十分確認出来る技術

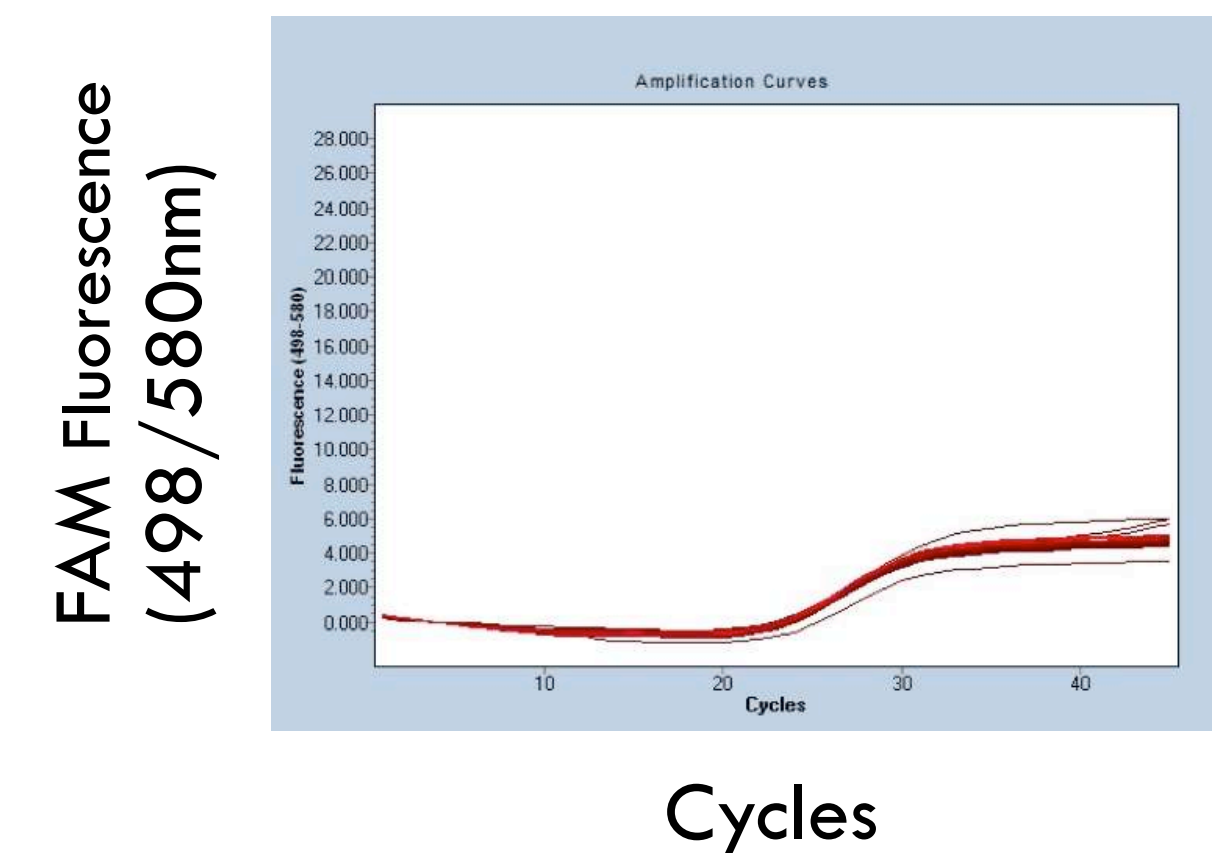
TOYOBO Ver2の検出限界は、10コピー/μL

検出限界 **LOQ (Limit of Quantification) of N1gene**

N1 gene (Cy5)



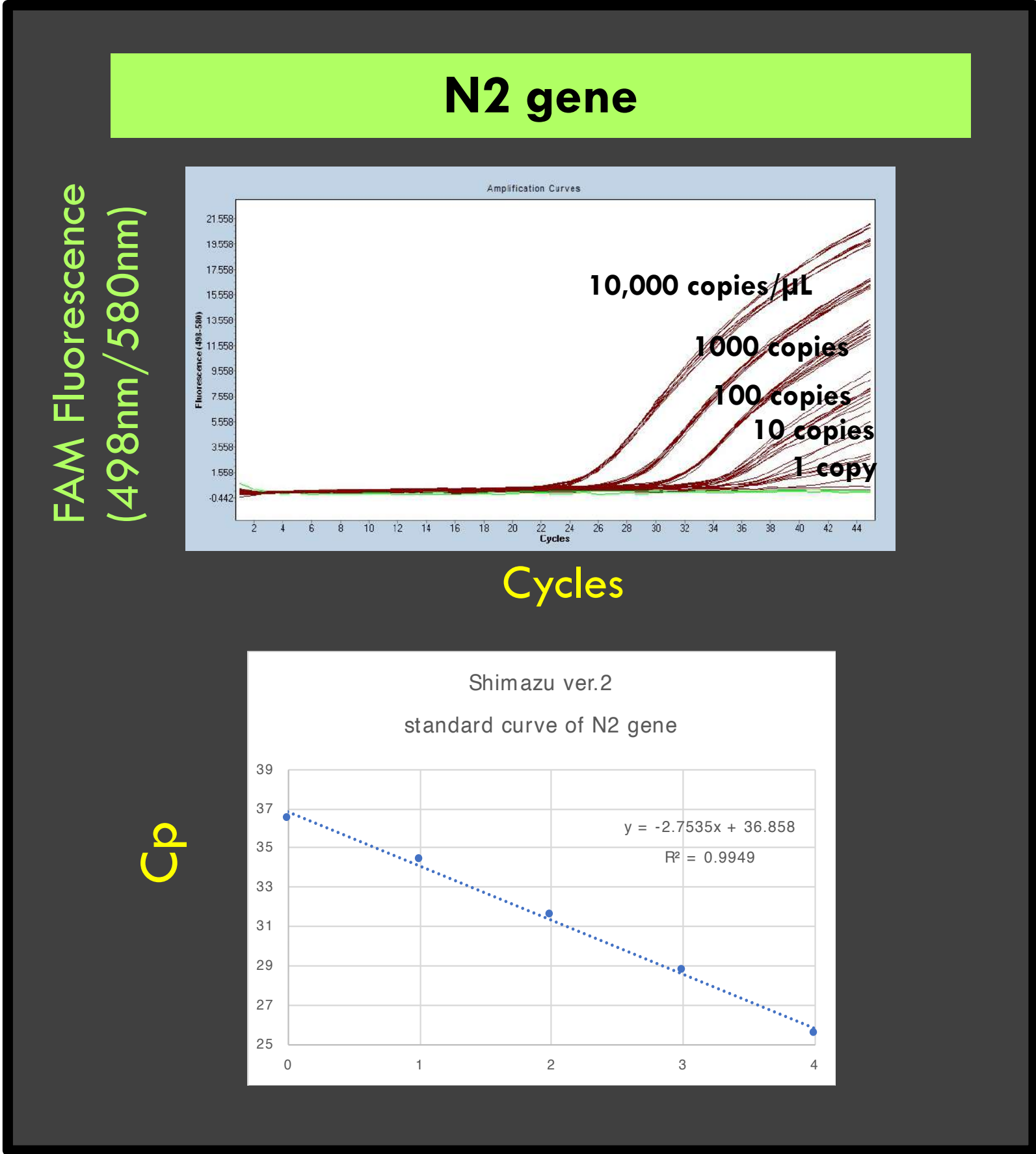
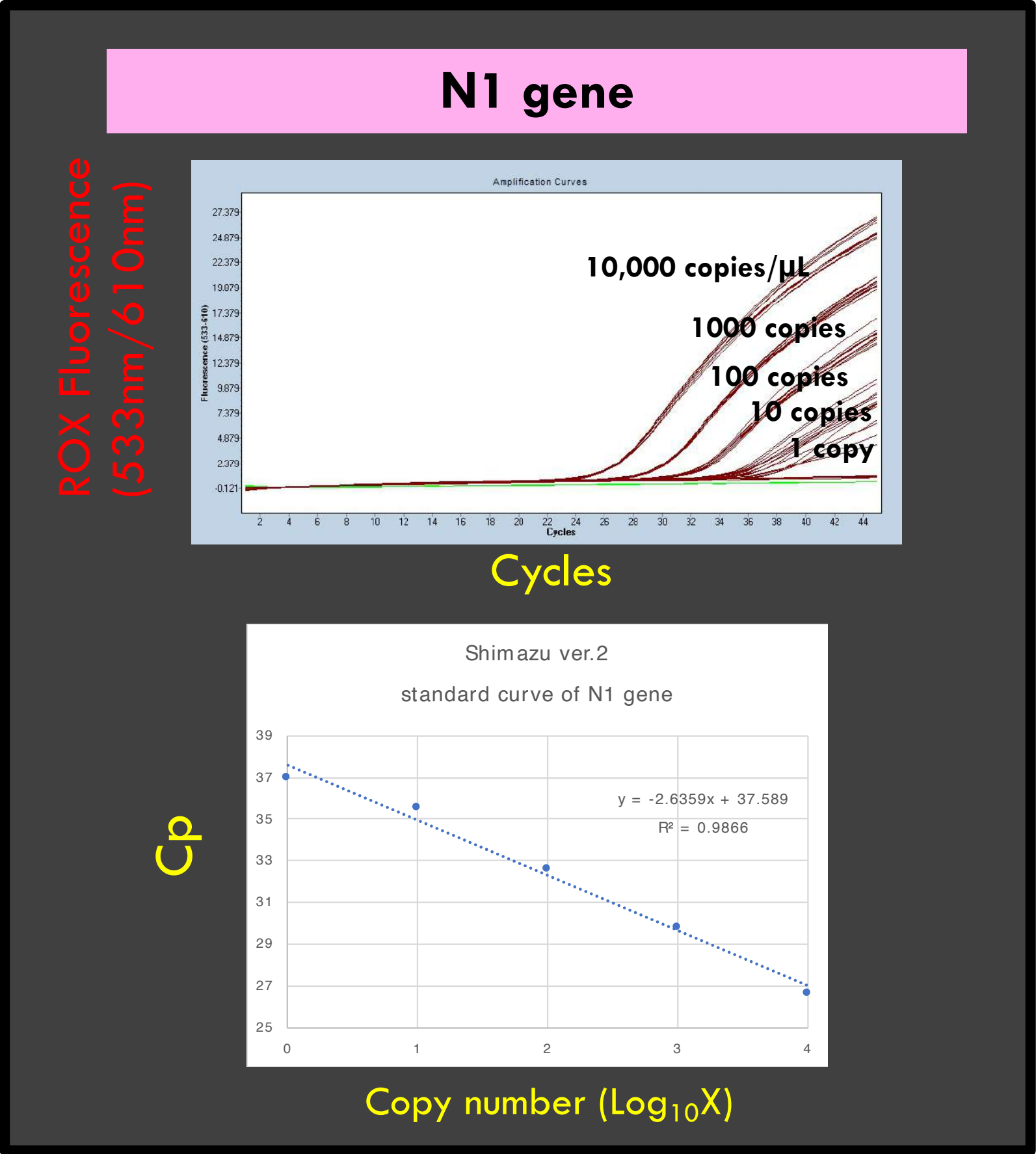
Internal control (FAM)



TOYOBO Ver.3 ≒ 10 copies/μL

SHIMAZU Ver2の検出限界は、1コピー/μL

検出限界 **LOQ (Limit of Quantification) of N1・N2 gene**



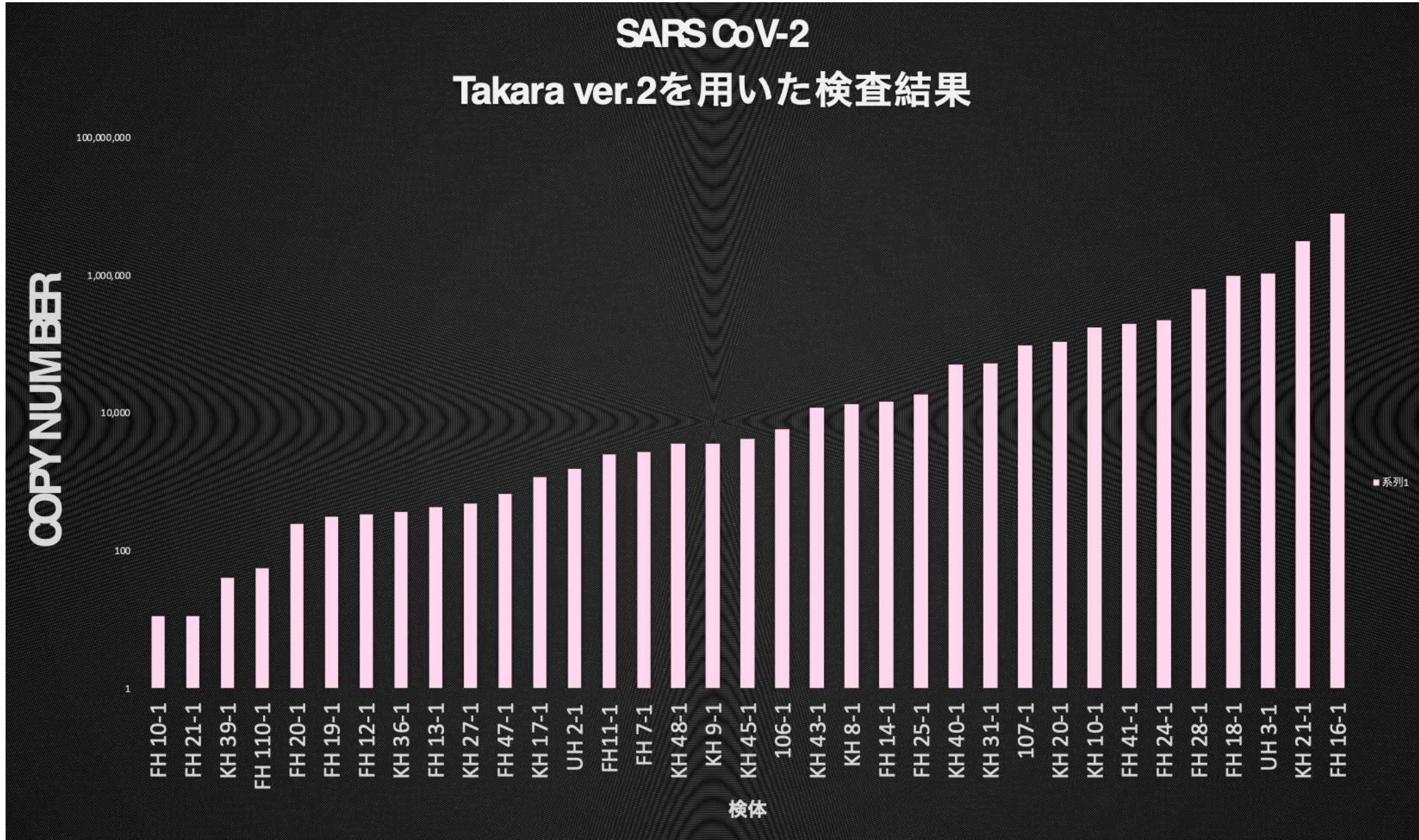
Shimazu Ver.2 ≒ 1 copy/μL

3社の新型コロナウイルスの検出限界

	LOQ (copy/ μ L)	LOQ (copy/mL)	必要検体量 /1 test	最終持ち込み 検体量 /well	検出限界感度 copy/well
Takara ver.2	1	1000	16 μ L	4.8 μ L	4.8
TOYOBO ver.3	10	10000	8 μ L	7.3 μ L	73
Shimazu ver.2	1	1000	5 μ L	5 μ L	5.0

逆転写及び遺伝子増幅時間	検出限界
1 時間以上	50ウイルスゲノムコピー/反応 以下
15分～1時間未満	100ウイルスゲノムコピー/反応 以下
15分未満	200ウイルスゲノムコピー/反応 以下

40検体中陽性で、copy数が一番低かったのは、11copies/ μ L



40検体中陽性で、copy数が一番低かったのは、11copies/ μ Lだった。



11copies/ μ Lは、Shimazu ver2, TOYOBO ver.3でも検出可能

下記の唾液検体(N=40)のduplicateの試験を、独立した2実験で判定した。

- 舟入病院
- 広島県病院
- 広島大学病院
- 行政検査検体

	LOQ (copy/	最終持ち込み 検体量	検出限界感度 copy/well
Takara ver.2	1	4.8 μ L	52.8
TOYOBO ver.3	10	7.3 μ L	80.3
Shimazu ver.2	1	5 μ L	55