

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) COVID-19等診断用核酸増幅検査薬(NAT検査薬)の信頼性確保に関する研究
(英語) Study to ensure the reliability of nucleic acid amplification tests (NAT)
for the diagnosis of COVID-19 and other infectious diseases

研究開発実施期間: 令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 築茂 由則
(英語) Tsukumo Yoshinori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長
(英語) National Institute of Health Sciences・Division of Molecular Targeted and Gene Therapy products・Section chief

II 研究開発の概要

【背景と目的】

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の拡大を受け、多数の核酸増幅検査薬（NAT：Nucleic acid amplification test、以下 NAT）が緊急に開発され、COVID-19 の診断補助に用いられた。これらの検査薬の開発時は臨床検体（陽性検体）の入手が困難であり、かつ、緊急に使用を認める必要があったことから、限定的な数の臨床検体で検査薬の性能が評価され、その多くは研究用試薬（薬事未承認）として使用許可されてきた。これを踏まえ我々は令和 2 年度において、緊急開発された NAT 検査薬の性能評価に関する調査研究ならびに NAT 検査薬の一斉性能比較試験を実施した。本研究では、これらの検討から抽出された「緊急開発される NAT 検査薬の信頼性確保に係る問題点・課題（後述）」を解決するための評価科学研究をウェット及びドライの両面から実施する。また、その成果に基づき、緊急開発される NAT 検査薬の信頼性確保に係る留意事項（開発の指針）を文書として取り纏める。

【実施内容と成果】

令和 2 年度に実施した緊急開発された COVID-19 診断用 NAT 検査薬の性能評価に関する調査研究ならびに NAT 検査薬の一斉性能比較試験の結果から、①性能評価に用いる検体の妥当性に関する検討、②関連病原体核酸とプライマーの相補性に関する検討、③反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討、を実施する必要があると考えられた。また、当初計画にはなかったが、研究開発期間における状況変化として、SARS-CoV-2 変異株への対応の観点から、④ウイルス変異が NAT 検査薬の感度に与える影響に関する検討についても、追加で実施することが望まれた。以下に、それぞれの実施項目について、実施内容と成果を記載する。

① 性能評価に用いる検体の妥当性に関する検討

上述のとおり、COVID-19 感染拡大初期においては臨床検体（陽性検体）の入手が困難であり、十分な数の臨床検体を用いた NAT 検査薬の評価は難しい状況であった。そこで、COVID-19 検査薬の性能評価に用いられた検体を調査した結果、国内では性能評価に少数の臨床検体（陽性検体 10、陰性検体 15）が用いられたのに対し、米国では早期に緊急使用許可を受けた NAT 検査薬の 8 割近くがウイルスゲノム RNA あるいは人工ウイルス RNA 等を生体試料にスパイクした「疑似臨床検体」を用いて、臨床性能評価が実施されていた。特にインビトロ転写により作製する人工ウイルス RNA については、ウイルスゲノム配列の公開直後から作製可能であることから、緊急開発される NAT 検査薬の性能評価試料として有用と考えられた。

本研究では、臨床性能評価に用いる疑似臨床検体の妥当性を検証するため、生体試料をマトリックスとする疑似臨床検体（唾液＋人工ウイルス RNA）を用いて、複数の COVID-19 診断用 NAT 検査薬についてウイルス RNA を検出することが可能かを検証した。その結果、生体試料中の RNA 分解酵素を検査薬に付属されている検体溶解液で予め不活化することが可能であれば、ウイルス RNA を検出できることがわかった。しかしながら、RNA 分解酵素を不活化できない検査薬が存在することから、RNA 分解酵素を含まない人工マトリックスを開発・整備する必要があると考えられた。

② 関連病原体核酸とプライマーの相補性に関する検討

FDA 及び WHO が発出した COVID-19 診断用 NAT 検査薬の緊急使用許可ガイダンスでは、SARS-CoV-2 の配列や症状と関連する病原体（SARS-CoV、MARS、インフルエンザウイルスなど）核酸と COVID-19 診断用 NAT 検査薬のプライマーの相補性が 80% 以上の場合に、関連病原体核酸を増幅しないことをウェット試験等で確認することが求められている。本研究では「相補性 80% 以上」を基準とすることの実効性を検証するため、国立感染症研究所、米国 CDC、中国 CDC、フランスパスツール研究所等が設計した COVID-19 診断用 PCR

プライマーについて、上記のガイダンスに記載された関連病原体（7種のコロナウイルス+32種の関連病原体）のゲノム配列との相補性を塩基配列検索ソフトウェア GGenome により解析した。この結果、ほぼ全てのプライマーが何かしらの関連病原体核酸と 80%以上の相補性を有することを見出した。その他の研究結果も踏まえ、本研究より、①関連病原体核酸とプライマーの相補性を検証する際には、相補性を有する配列を漏れなく検索できるソフトウェアを使用する必要があること（汎用される塩基配列検索ソフトウェアである Blast は検索漏れが多く生じ不適であること）、②「相補性 80%以上」の基準のみでウェット試験の必要性を判断する指標は適切ではなく、2本（フォワードおよびリバース）のプライマーと病原体核酸との相補性など別の指標を加味した方がよいと考えられること、などを明らかにした。

③ 反応系に含まれる夾雑物の影響に関する検討

COVID-19 診断用 NAT 検査薬については、検体から RNA 精製を行う検査薬と行わない検査薬の 2 つに大別されるが、検体中に存在する夾雑物のうち宿主由来の核酸（ヒト核酸）については、RNA 精製を行う場合においても、ウイルス RNA とともに精製カラムに吸着するため分離除去することができない。したがって、核酸増幅検査において、ウイルス検出プライマーがヒト核酸と相補結合し、ヒト核酸を増幅するオフターゲット増幅が引き起こされる可能性が原理的に考えられる。これを踏まえ、本研究ではオフターゲット増幅が実際にどの程度起こり、ウイルス核酸の検出感度にどの程度影響を及ぼすかについて検証を行った。具体的には、汎用プライマー設計ソフトウェアを用いて、プライマーが備えるべき基本的要件（至適 Tm 値、GC 含有率など）を満たす数百のプライマーセットを設計し、ヒト核酸存在下におけるオフターゲット増幅発生の有無とウイルス核酸検出感度への影響を検討した。その結果、検討したプライマーセットの 25%でオフターゲット増幅が生じ、これらのプライマーセットでは標的ウイルス核酸の検出感度が大きく低下する傾向があることを明らかにした。このようなオフターゲット増幅を引き起こすプライマーについては、ヒト核酸を豊富に含む臨床検体において偽陰性が生じる確率が高いため、NAT 検査薬開発における留意事項文書において、ヒト核酸のオフターゲット増幅に関する注意点を明示することが望まれる。

④ ウイルス変異が NAT 検査薬の感度に与える影響に関する検討

ウイルス変異が NAT 検査薬の感度に与える影響を検討するため、国立感染症研究所が設計した 2 つのプライマーセットをモデルとして、プライマー相補結合領域上の変異が検出感度や増幅効率に及ぼす影響を検討した。具体的には、各プライマーの相補結合領域に変異を導入した一本鎖 DNA を約 50 種合成し、これら変異鋳型 DNA を用いて核酸増幅反応の変化について検討した。その結果、プライマーのより 3'末端側（増幅領域のより内側）に生じる変異ほどウイルス核酸の検出感度および増幅効率が低下する傾向があることなどを見出した。本研究を踏まえ、ウイルス変異がプライマー設計領域に存在しないかを常に確認すること、変異が確認された場合には検出感度等をウェット検証することが望まれる。また、ひとつの検査薬において複数のプライマーセットを備えたマルチプレックス検査薬にすることが望まれる。

COVID-19 拡大初期においては、FDA 及び WHO から COVID-19 診断用検査薬の開発促進を目的とした緊急使用許可ガイダンスが発出され、これを基に NAT 検査薬の性能評価が行われた。本研究ではこれらのガイダンスに記載された性能評価の考え方をベースに、上記の研究項目①～④で得られた知見を補足として追記することで、「緊急時に開発される核酸増幅検査薬の性能評価に関する考え方」を文書として取り纏めた。

【意義】

本研究では、NAT 検査薬に使用するプライマーの設計や検体中に混入するヒト核酸との相補性などの観点

から、NAT 検査薬の開発時に留意すべき点を見出した。これらの留意事項を加味した指針案を開発側に提示していくことで、次のパンデミック発生時に開発される NAT 検査薬開発の信頼性確保に貢献するとともに、検査体制の向上にもつながるものと期待される。

英文：

With the spread of a novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) in early 2020, dozens of nucleic acid amplification test (NAT) kits were developed in Japan and used to diagnose COVID-19. Since clinical specimens were difficult to obtain at the time of development of these NAT kits and their use needed to be approved urgently, the performance of these kits was evaluated on a very limited number of clinical specimens, and most of them were exceptionally permitted to be used as "research reagents" for COVID-19 diagnosis. Based on this, in 2020, we conducted a survey and performance comparison study of those NAT kits. In this study, we conducted both wet and dry evaluation studies to solve the "problems and issues related to ensuring the reliability of urgently developed NAT test reagents (see (1)-(4) below)" that were extracted from the studies in 2020.

The brief results of each study are as follows.

(1) Study on the validity of specimens used for performance evaluation

To verify the validity of pseudo-clinical specimens for clinical performance evaluation, we tested the feasibility of detecting viral RNA for several COVID-19 diagnostic NAT kits using pseudo-clinical specimens. The results showed that viral RNA could be detected if the RNases in the biological specimen could be inactivated in advance with the specimen lysate provided with the test reagent. However, since some reagents cannot inactivate RNases, it was considered necessary to develop and maintain an artificial matrix that does not contain RNases.

(2) Study on the complementarity of primers with relevant pathogen genomes

By in silico analysis using an ultrafast and accurate sequence search system, we showed that most of the PCR primers for COVID-19 diagnoses designed by the national institutes exceeded the guideline criteria of 80% complementarity with any of the relevant pathogen sequences.

(3) Study on the influence of host cell-derived nucleic acids on the detection sensitivity of NAT

Using hundreds of primers designed with common primer design software, we investigated how often off-target amplification occurs in the presence of human genomic DNA and how off-target amplification affects the detection sensitivity of viral nucleic acids. As a result, we found that off-target amplification can occur relatively frequently and that the detection sensitivity of target viral nucleic acids was reduced in the primer sets that caused off-target amplification.

(4) Study on the effect of viral mutations on the sensitivity of NAT

Using the DNA templates with a mutation at each position within the primer binding region as the model, we showed that the detection sensitivity of NAT decreased if the mutation was closer to the primer 3' end.

Along with new considerations based on the results of the studies (1) – (4) above, we summarized the requirements for performance evaluation described in the emergency use authorization guidance issued by the FDA and WHO in the early stages of the COVID-19 pandemic.