

SARS-CoV-2不活化試薬 不活化試験

本製品は体外診断用医薬品ではありません。

方法

- [装置] アプライドバイオシステムズ 7500Fast DX (医療機器届出番号：13B1X10227000001 Thermo Fisher Scientific)
- [試薬] CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)
SARS-CoV-2 不活化試薬 (シスメックス)
MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kit (シスメックス)
QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)
- [材料] 培養細胞株
神奈川県衛生研究所で分離された「SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (GenBank: LC528232)」

[不活化効果に関する検討 感染価の測定 (方法)]

検体を本品により保存した場合のウイルス (SARS-CoV-2) 不活化能を評価した。

ウイルス液 10^7 TCID₅₀/mL^{※1} (予備試験1参照) 100μLとSARS-CoV-2 不活化試薬またはPBS(対照) 100μLを混合し、室温10分間静置した後、反応させた各溶液を 10^3 倍から 10^6 倍まで段階希釈したもの(予備試験2参照) 100μLを、等量の細胞を分注した6ウェルずつに接種して1週間培養し、細胞変性が認められたウェル数からウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を評価した。

計算にはBehrens-Karber法を用いた。

※1 TCID : Tissue Culture Infectious Dose

細胞にウイルスを接種することによって、その50 %でCPE(細胞変性効果;ウイルス感染によって形状が変化した細胞)が観察されるウイルス量である。Behrens-Karber法では、1ウェル中のTCID₅₀は以下の式で求められる。

$$TCID_{50} = (\text{最も低い希釈倍率}) \times (\text{段階希釈した倍率})^{\Sigma-0.5}$$

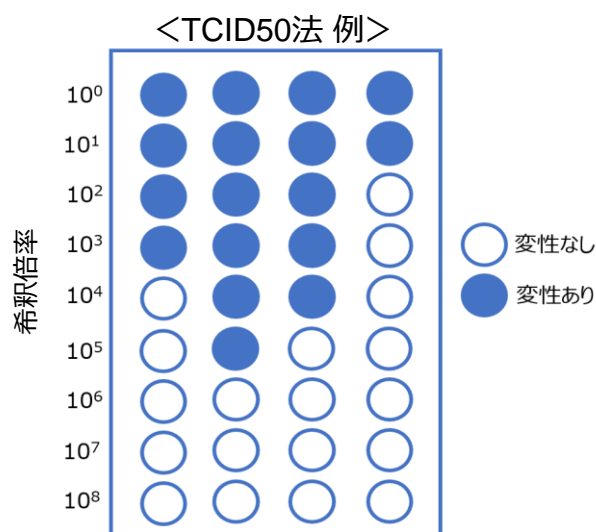
$$\Sigma = (\text{各希釈段階における細胞変性が認められたウェル数}) / (\text{検体数}) \text{ の総和}$$

図の例では、 $\Sigma = 4/4+4/4+3/4+3/4+2/4+1/4+0/4+0/4+0/4=4.25$

$$TCID_{50} = 10^0 \times 10^{4.25-0.5}$$

このとき接種したウイルス液量が50μLであれば、このウイルス液の感染価は

$$TCID_{50}/mL = 10^{3.75} / 0.05 = 2 \times 10^{4.75} \text{ となる。}$$



[不活化効果に関する検討 感染価の測定（結果）]

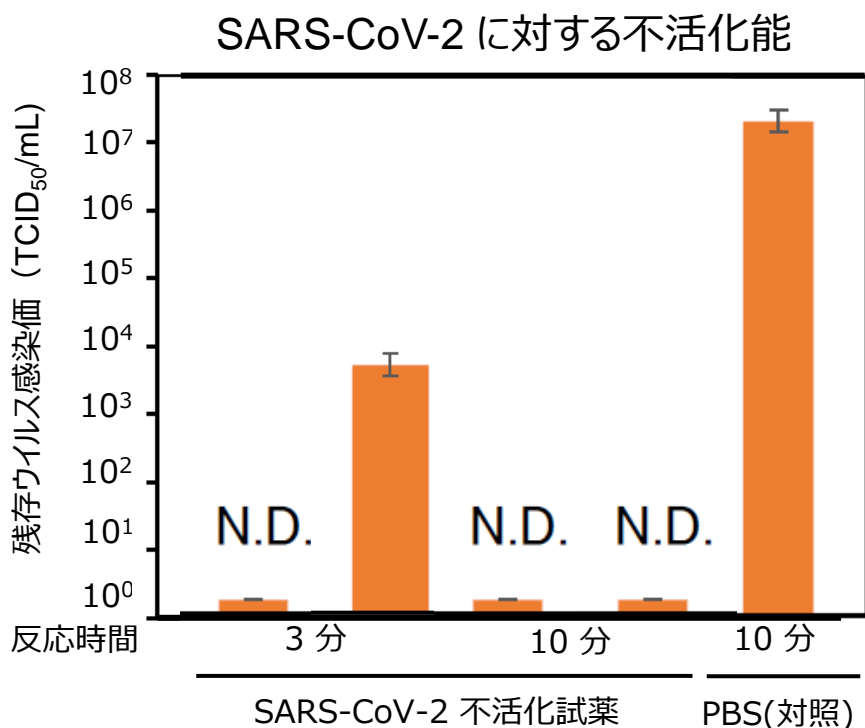
10³倍～10⁶倍希釈した反応液を接種したウェルのうち、細胞変性が認められた数は下表のとおりであった。

この結果をもとにBehrens-Karber法を用いてウイルス感染価（TCID₅₀/mL）を求めたところグラフのとおりとなった。

反応液を細胞に接種し室温で10分間静置した試料では、対照（PBS）では感染価が維持されていたのに対し、本品では検出されずSARS-CoV-2 が不活化されていることを確認した。

細胞変性が認められたウェル数

溶液	本品				PBS (対照)
	反応時間	3分 (n=2)	10分 (n=2)	10分 (n=2)	10分 (n=1)
10 ³	0/6	1/6	0/6	0/6	6/6
10 ⁴	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
10 ⁵	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6
10 ⁶	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6

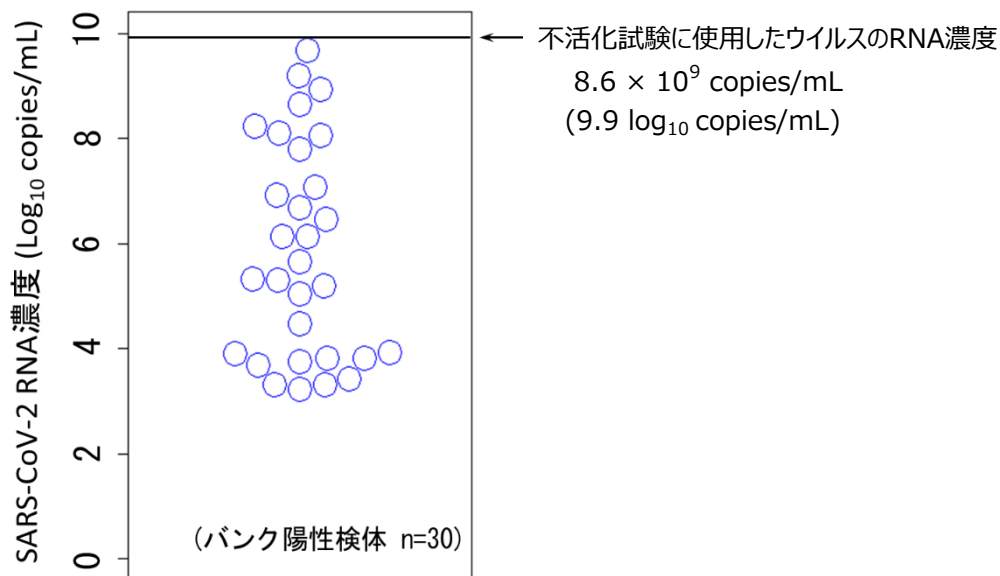


[予備試験1 試験に用いたウイルスRNA濃度に関する検討（方法）]

不活化試験に使用した10⁷ TCID₅₀ /mLのSARS-CoV-2溶液より、MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kitを用いてウイルスRNAを抽出し、アプライドバイオシステムズ 7500Fast DXを用いて国立感染症研究所の病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1に準拠して測定した。得られたウイルスRNA濃度を、過去に測定された臨床検体と比較した。

[予備試験1 試験に用いたウイルスRNA濃度に関する検討 (結果)]

不活化試験に使用した 10^7 TCID₅₀/mLのSARS-CoV-2 溶液より 8.6×10^9 copies/mL (Ct値では13.6相当) のウイルスRNAを検出した。これは社内検討で評価した臨床検体における最も高濃度の検体と同等の数値であり、ほとんどの臨床検体は不活化されることが示された。



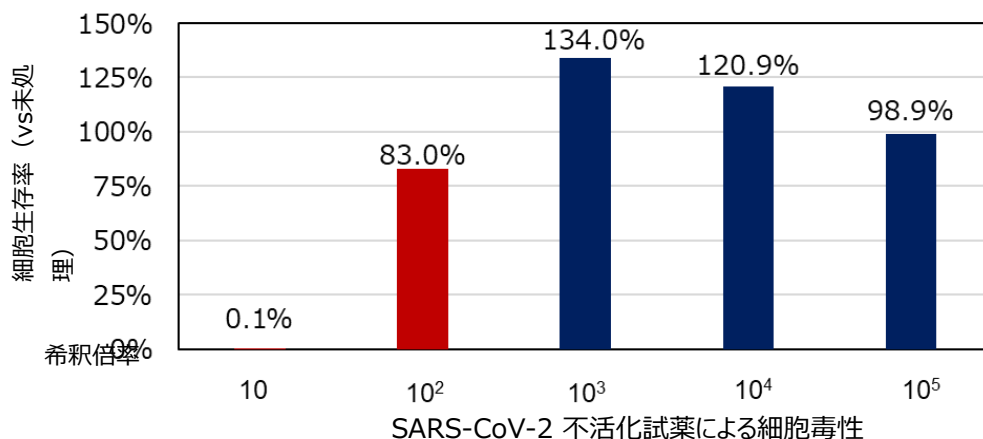
[予備試験2 SARS-CoV-2 不活化試薬の培養細胞に与える影響の検討 (方法)]

不活化効果に関する検討に供する不活化試薬濃度の条件設定のための検討を実施した。

5×10^4 cells /100 μ Lに調製した培養細胞株にSARS-CoV-2 不活化試薬希釈溶液 ($10 \sim 10^5$ 倍に培地で希釈) または培地 (対照) を100 μ L添加した。72時間培養後にCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assayを用いて細胞数を測定した。対照群を100%として、各希釈液を添加した培養細胞の生存率を算出した。

[予備試験2 SARS-CoV-2 不活化試薬の培養細胞に与える影響の検討 (結果)]

10^2 倍希釈では、細胞の生存率が対照と比較して83.0%であり、細胞毒性が認められたため、不活化効果に関する検討には $10^3 \sim 10^6$ の希釈系列を用いることとした。



SARS-CoV-2不活化試薬によるRNA安定性試験

本製品は体外診断用医薬品ではありません。

方法

SARS-CoV-2不活化試薬を反応させた各検体を4℃および25℃で9日間保存した場合のウイルスRNAの安定性を評価した。

- [装置] アプライドバイオシステムズ 7500Fast DX (医療機器届出番号：13B1X10227000001 Thermo Fisher Scientific)
QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- [試薬] SARS-CoV-2不活化試薬
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
2019-nCoV検出蛍光リアルタイムRT-PCRキット (体外診断用医薬品承認番号：30200EZ00017000 シスメックス)
- [検体] 健常人の口腔ぬぐい液および唾液
- [材料] AccuPlex SARS-CoV-2 Verification Panel (Sera care:0505-0168)

[口腔ぬぐい液試料調製]

滅菌綿棒にて健常人の口腔内を十分にぬぐい、綿棒を3 mLのSARS-CoV-2不活化試薬に入れてよく懸濁したのに対し、2019-nCoV標準物質 (AccuPlex SARS-CoV-2 Verification Panel 1.0×10^5 copies/mL) を 2.5×10^3 copies/mLとなるように添加した。

[唾液試料調製]

2019-nCoV標準物質の濃度が 1.0×10^4 copies/mL^{※1}となるように添加した唾液にSARS-CoV-2不活化試薬を3倍量添加して希釈したもの (4倍希釈 2.5×10^3 copies/mL) および2倍量添加して希釈したもの (3倍希釈 3.3×10^3 copies/mL)^{※2}を試料とした。

※1 唾液試料調製後のウイルスコピー濃度が臨床検体の唾液における最低濃度と同等になるように調製した。

(参考文献：medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>)

※2 本品の使用法 (3 mLの試薬に対して唾液を1.0~1.5 mL添加) に基づき、4倍希釈および3倍希釈で調製した。

[RNA安定性に関する検討]

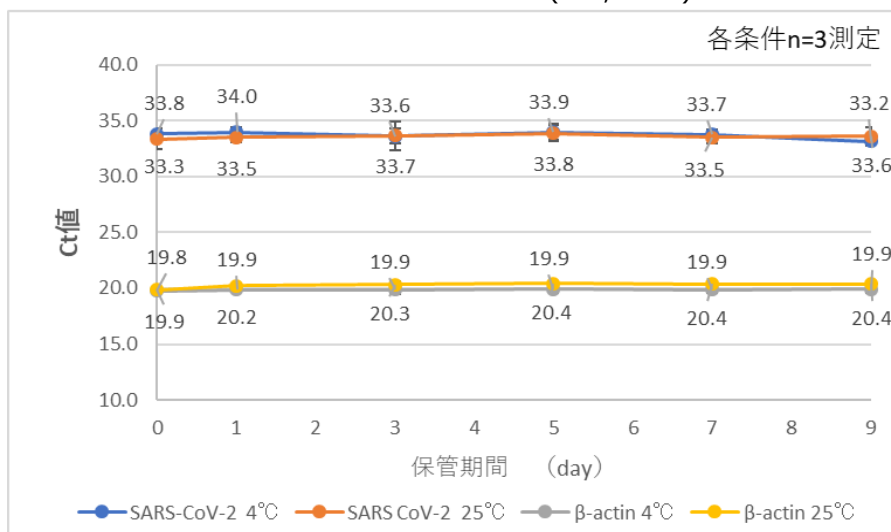
各試料を4℃ (冷蔵環境) および25℃ (室温環境) にて、0、1、3、5、7、9日間保存した後、各試料からQIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてRNAを抽出し、アプライドバイオシステムズ 7500Fast DX (4℃保存の試料) またはQuantStudio 5 Real-Time PCR System (25℃保存の試料) を用いて2019-nCoV検出蛍光リアルタイムRT-PCRキットで3回測定し、SARS-CoV-2遺伝子およびβ-actin遺伝子の平均量 (Ct値) の変化を確認した。

結果

[口腔ぬぐい液検体におけるRNA安定性]

口腔ぬぐい液検体を、SARS-CoV-2不活化試薬を用いて4℃および25℃で9日目まで保管した場合、抽出したRNA中の2019-nCoV遺伝子およびβ-actin遺伝子の量 (Ct値) について、0日目と比較した検定による有意差は認められず (p>0.05)、検体中のRNAが安定して維持されていることを確認した。

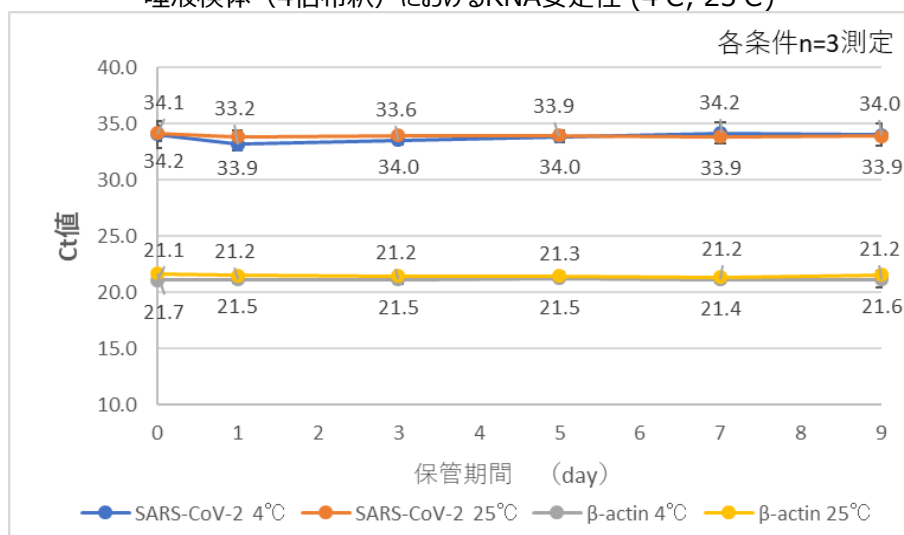
口腔ぬぐい液検体におけるRNA安定性 (4℃, 25℃)



[唾液検体 (4倍希釈) におけるRNA安定性]

唾液検体 (4倍希釈) を、SARS-CoV-2不活化試薬を用いて4℃および25℃で9日目まで保管した場合、抽出したRNA中の2019-nCoV遺伝子およびβ-actin遺伝子の量 (Ct値) について、0日目と比較したt検定による有意差は認められず (p> 0.05)、検体中のRNAが安定して維持されていることを確認した。

唾液検体 (4倍希釈) におけるRNA安定性 (4℃, 25℃)



[唾液検体 (3倍希釈) におけるRNA安定性]

唾液検体 (3倍希釈) を、SARS-CoV-2不活化試薬を用いて4℃および25℃で9日目まで保管した場合、3日目までは0日目と比較したt検定によるCt値の上昇に有意差がないことを確認した (p> 0.05)。

唾液検体 (3倍希釈) におけるRNA安定性 (4℃, 25℃)

