

SARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2 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] SARS-CoV-2 不活化試薬 Ver.2 (シスメックス)
 QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)：予備検討で使用
 MGIEasy Nucleic Acid Extraction Kit (シスメックス)：予備検討で使用
- [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 (試験法)]

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}) 100μLとSARS-CoV-2 不活化試薬 Ver.2またはPBS (対照) 100μLを混合し、室温で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 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。

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

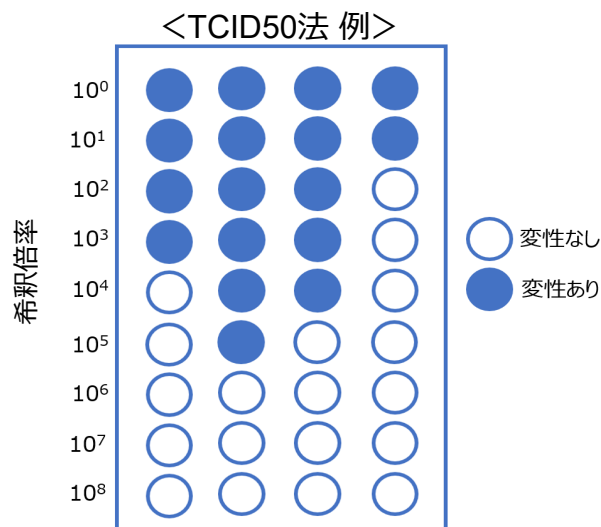
$$\Sigma = (\text{各希釈段階における細胞変性が認められたウェル数}) / (\text{検体数}) \text{ の総和}$$

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

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



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。

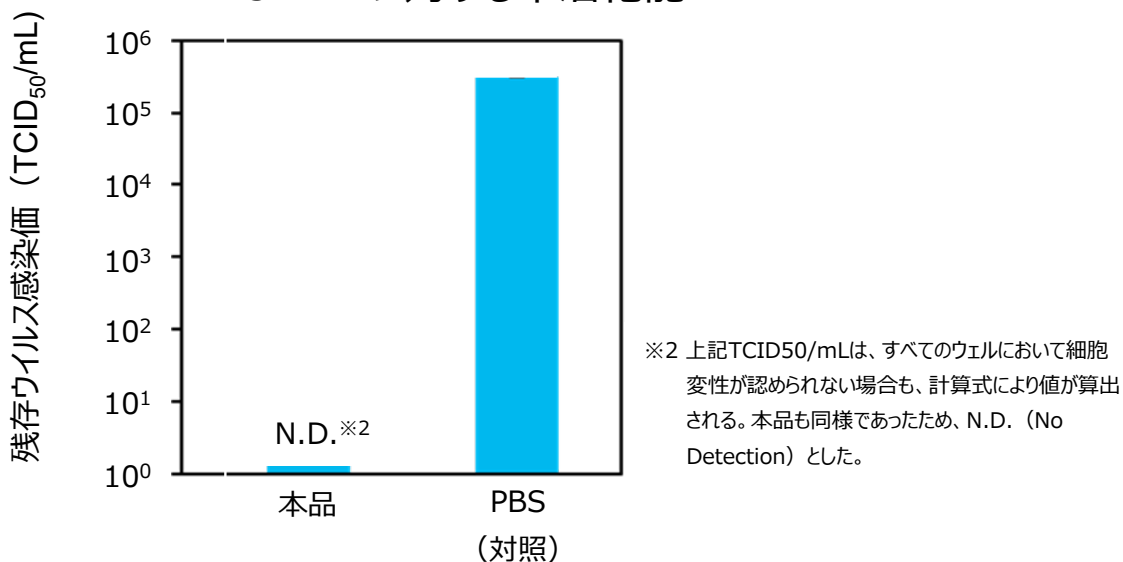
この結果をもとにBehrens-Karber法を用いてウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を求めたところグラフのとおりとなった。

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

希釈倍率	本品	PBS (対照)
10 ³	0/6	6/6
10 ⁴	0/6	6/6
10 ⁵	0/6	0/6
10 ⁶	0/6	0/6

SARS-CoV-2 に対する不活化能



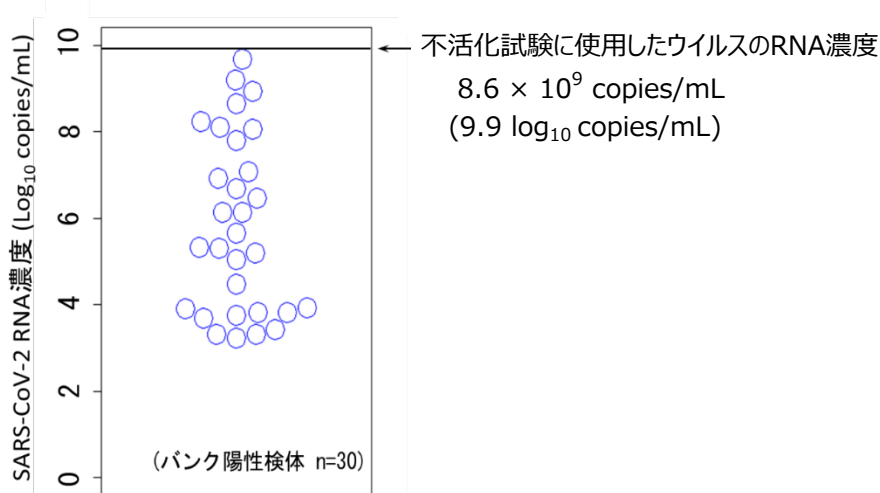
■ 参考データ

[予備検討：試験に用いたウイルスRNA濃度に関する検討]

試験に用いたウイルスRNA濃度は、過去に実施した以下の検討結果に基づき決定した。

(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。

(結果) 不活化試験に使用した10⁷ TCID₅₀/mLのSARS-CoV-2 溶液より、8.6 × 10⁹ 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。



SARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2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 Ver.2を反応させた各検体を4℃および25℃で7日間保存した場合、さらに-80℃で凍結融解を繰り返した場合の、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 (Thermo Fisher Scientific)
[試薬] SARS-CoV-2 不活化試薬 Ver.2 (シスメックス)
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)
[検体] 鼻咽頭ぬぐい液：陰性購入検体、鼻腔ぬぐい液および唾液：健康人より入手
[材料] SARS-CoV-2 コントロールウイルス：AccuPlex SARS-CoV-2 Verification Panel - Full Genome (Seracare)

[鼻咽頭ぬぐい液試料調製]

陰性購入検体をSARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2によく懸濁したのに対し、SARS-CoV-2 コントロールウイルスを 5.0×10^3 copies/mLとなるように添加した。

[鼻腔ぬぐい液試料調製]

滅菌綿棒にて健康人の鼻腔内を十分にぬぐい、綿棒をSARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2に入れてよく懸濁したのに対し、SARS-CoV-2 コントロールウイルスを 5.0×10^3 copies/mLとなるように添加した。

[唾液試料調製]

SARS-CoV-2 コントロールウイルスを濃度が 1.5×10^4 copies/mLとなるように添加した唾液に、SARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2を2倍量添加して希釈したもの（3倍希釈 5.0×10^3 copies/mL）※を試料とした。

※本品の使用方法（3mLの試薬に対して唾液を1～1.5mL添加）に基づき、最大量添加した場合を想定して3倍希釈で調製した。

[試験法]

1. 4℃および25℃におけるRNA保存安定性

各試料を4℃（冷蔵）および25℃（室温）にて0、2、4、7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（n=3）、アプライドバイオシステムズ 7500Fastを用いてQuantiTect Probe RT-PCR Kitで測定し（2重測定）、SARS-CoV-2のCt値の変化を確認した。

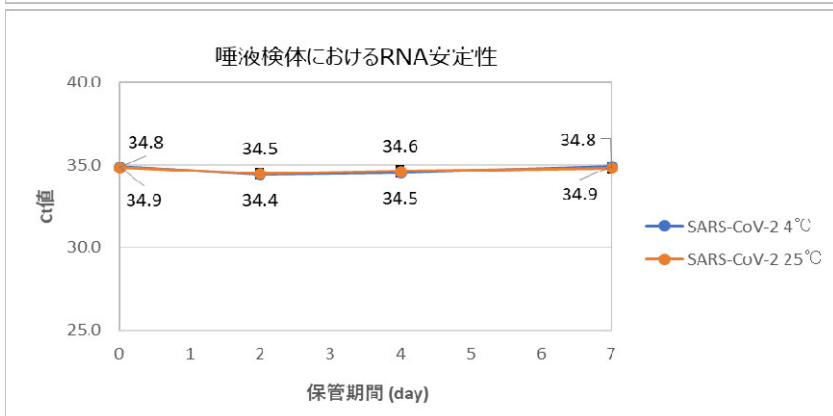
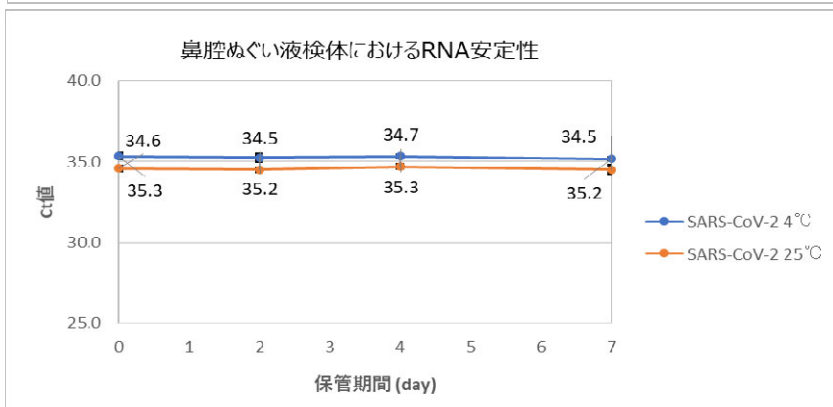
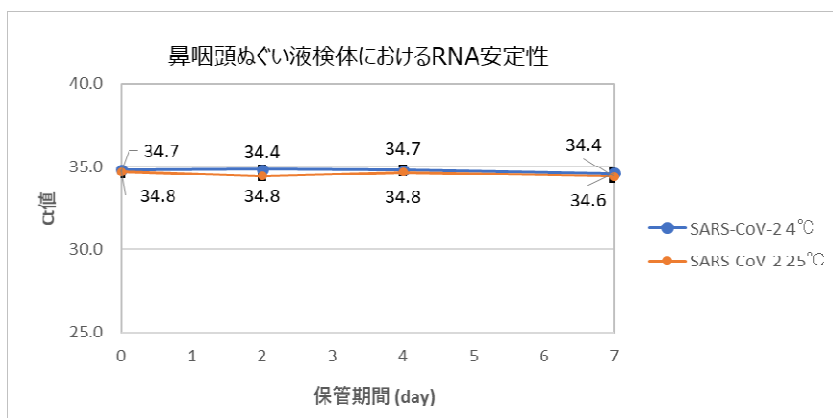
2. -80℃での凍結融解におけるRNA安定性

唾液試料を-80℃で保存し、室温で融解した。この作業を1、3、5回繰り返した後、各試料からQIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてRNAを抽出し（n=3）、アプライドバイオシステムズ 7500Fastを用いてQuantiTect Probe RT-PCR Kitで測定し（2重測定）、SARS-CoV-2のCt値の変化を確認した。なお凍結融解0回として凍結前の唾液試料を同様の方法で測定し、Ct値を取得した。

結果

1. 4℃および25℃におけるRNA保存安定性

鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液の各試料を、SARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2を用いて4℃および25℃で7日目まで保管した場合、各試料におけるSARS-CoV-2の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なかった ($p > 0.05$)。



2. -80℃での凍結融解におけるRNA安定性

唾液試料をSARS-CoV-2不活化試薬 Ver.2を用いて-80℃にて1、3、5回凍結融解した場合、SARS-CoV-2のCt値について、凍結前と比較したt検定による有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

