

体外診断用医薬品

製造販売承認番号：30200EZ00076000

SARS コロナウイルス核酸キット Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット

*【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. 診断は厚生労働省より発表されている医療機関・検査機関向けの最新情報を参照し、本品による検査結果のみで行わず、臨床症状も含めて、医師が総合的に判断してください。
3. 検体採取、取扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください。
4. 検査に用いる検体については、厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針」を参照してください。
5. 鼻腔ぬぐい液を検体とした場合、適切な検体採取が行われないと正しい結果を得られない可能性があるため、【操作上の注意】をよく読み、1 本のスワブで必ず両鼻腔から採取してください。

【一般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的で使用しないでください。
2. 添付文書に記載された使用目的および操作方法に従って使用してください。記載された使用目的および操作方法以外で使用的場合には、性能を保証しません。
3. 使用する機材の取扱説明書をよく読み、その指示に従ってください。
4. 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありうるので、本品の使用にあたっては、遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導のもとで検査を実施すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット

	100 反応分	1000 反応分
1. 前処理液	875 μ L×1 本	8.8 mL×1 本
成分：タンパク質分解酵素		
2. 反応液	900 μ L×2 本	18 mL×1 本
成分：逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ、ウラシル-N-グリコシラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸		
3. プライマー・プローブ液	375 μ L×1 本	3.6 mL×1 本
成分：2019-nCoV_N1 F-primer / R-primer / Probe、2019-nCoV_N2 F-primer / R-primer / Probe、RP F-primer / R-primer / Probe		
4. 滅菌水	1.1 mL×1 本	11 mL×1 本
5. ROX Reference Dye II	90 μ L×1 本	900 μ L×1 本

【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、検体種を選択すること。

【測定原理】

本品は蛍光プローブを組み合わせた RT-PCR 法により、生体試

料中に含まれる SARS-CoV-2（N 遺伝子）および内在性コントロール（IC: Internal Control、ヒト RNaseP 遺伝子）の RNA を検出するキットです。SARS-CoV-2 の N 遺伝子の検出には、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)¹⁾ に記載されたプライマー・プローブを使用しています。

本品の測定は以下の 2 つのステップからなります。

1. 前処理（核酸の簡易抽出）
生体試料と「前処理液」を混合し熱処理を行うことにより、生体試料に含まれる核酸の簡易抽出を行います。
2. リアルタイム RT-PCR
逆転写反応により RNA から cDNA を合成し、続いて、PCR により cDNA 中の標的配列の増幅および検出を行います。リアルタイム RT-PCR 反応液には、5'側を蛍光物質で、3'側をクエンチャー物質で修飾したプローブが含まれており、SARS-CoV-2 遺伝子は Cy5 の蛍光で、内在性コントロールは FAM の蛍光で検出します。アニール条件下では、プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、耐熱性 DNA ポリメラーゼの持つ 5'→3'exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

*【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法
患者検体の採取、輸送方法については、厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針」を参照してください。不適切な保存や凍結融解により測定結果に影響が生じる可能性があります。
2. 測定試料の調製法
粘性の低い検体はそのまま使用し、粘性の高い検体は粘性を低減させるための処理を行った後に使用することをお勧めします。測定試料の調製方法の例を以下に示しますが、これに限定されるものではありません。ただし、他の調製法を用いる場合は、性能を確認した上で使用してください。
 - ① 鼻咽頭ぬぐい液や鼻腔ぬぐい液は、厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症（COVID-19）病原体検査の指針」に従って採取した検体をそのまま使用してください。なお、鼻腔検体の場合は、1 本のスワブで両鼻腔をぬぐい、ウイルス輸送液やウイルス保存液に懸濁したものを検体として使用してください。
 - ② 唾液検体は、約 3 倍量のスプタザイム酵素液（極東製薬工業）を添加し、攪拌した後、室温で約 15 分間静置したものを検体として使用してください。
3. 妨害物質・妨害薬剤
下記の物質は、表示した濃度まで測定試料に添加しても、測定に影響しませんでした。
グアニジンチオシアン酸塩 5%、エタノール 30%、DTT (dithiothreitol) 2%、全血 2%、フェニレフリン塩酸塩 2 mg/mL、オキシメタゾリン塩酸塩 2 mg/mL、塩化ナトリウム 20 mg/mL、トリウムシノロンアセトニド 2 mg/mL、ヒスタミン二塩酸塩 2.5 mg/mL、アジスロマイシン 1 mg/mL、ミノサイクリン塩酸塩 2.4 μ g/mL、クリンダマイシン塩酸塩 26 μ g/mL
また、以下のウイルス輸送液を測定試料として添加しても、測

定に影響しませんでした。

BioServUK ウイルス試料輸送・保存滅菌済みメディア（エムエステクノシステムズ、BSV-VTM-001）、BioerTechnology ウイルス保存/輸送用試薬（ウイルス不活化成分 非含有）（日本ジェネティクス、BSC85N1）

※上記の濃度以上の妨害物質や妨害薬剤を含む場合及び不活化剤等を含むウイルス輸送液を使用する場合は、「新型コロナウイルス感染症のPCR検査等における精度管理マニュアル」²⁾を参照の上、検査性能特性の評価を行ってください。例えば、RNA精製を行う場合は、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」³⁾に記載された方法でRNA精製を行った後、本品で「3. 前処理（核酸の簡易抽出）」を実施せず、「5. 測定試料およびコントロールの添加」の②において、精製RNAを6 µL分取し、分注済のマスターミックスに添加します。RNA精製が必要なウイルス輸送液を以下に例示します。

- Universal Transport Medium (UTM) /SARS-CoV2 不活化試薬（シスメックス）
- BioerTechnology ウイルス不活化 保存/輸送用試薬（日本ジェネティクス）
- 4. 交差反応性

本品は、下記の微生物由来のRNA又はDNAと交差反応性を示しませんでした。

Coronavirus-SARS, MERS-CoV, Coronavirus (Strain: NL63), Coronavirus (Strain: OC43), Coronavirus (Strain: 229E), Influenza A virus (H1N1), Influenza B virus, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* T1

本品の交差反応性を判定するために、viralSITE データベース※から取得したウイルスゲノム配列 (Release 2020.2 [16-Mar-2020]) およびNCBIデータベースから取得したヒトゲノム配列とトランスクリプト配列 (Genome Reference Consortium Human Build 38) に対して、*in silico* 解析を行った結果、SARS-CoV-2以外のウイルスで潜在的な意図しない交差反応による検出の可能性は認められませんでした。

※viralSITE: <http://www.virusite.org/index.php?nav=search>

5. コンタミネーションの防止

本品では、ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加することで、PCR増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性判定を抑止しております。しかしながら、大量のPCR増幅産物による汚染やクロスコンタミネーションには十分注意してください。

コンタミネーション防止のため、リアルタイムRT-PCR反応液の調製は操作毎にエリア分けをして、物理的に隔離することを推奨します。

○ エリア1：反応液の調製を行います。

○ エリア2：反応液と鋳型の混合を行います。

本品では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。コンタミネーション発生の原因となりますので、PCR増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

6. その他の留意事項

- ① 「反応液」を使用する際には、泡立てないよう穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合し、軽くスピンドアウンしてからご使用ください。
- ② 「反応液」以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドアウンしてからご使用ください。
- ③ 「プライマー・プローブ液」および「ROX Reference Dye II」は、遮光に留意してください。
- ④ 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。

- ⑤ 万一、サンプルやプローブ、プライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。器具類はRNase/DNaseフリーのものを使用してください。
- ⑥ マスターミックスの分注と鋳型添加は、室温で行ってください。氷上で行うと、qPCR実施時の温度変化により蛍光検出に影響を及ぼすことがあります。
- ⑦ qPCR実施前に反応液に気泡がないことを確認してください。気泡があると蛍光検出に影響を及ぼすことがあります。

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な器具・器材・試薬等

- ① マイクロピペット
 - ② マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付き）
 - ③ マイクロチューブ（RNase/DNaseフリー）
 - ④ 熱処理用サーマルサイクラーまたはヒートブロック（リッドヒーター付きのもの）
 - * ⑤ リアルタイムPCR装置（「新型コロナウイルス感染症のPCR検査等における精度管理マニュアル」²⁾を参照し検査性能特性評価を実施の上、使用してください。）
 - ⑥ リアルタイムPCR用容器（8連チューブもしくは96ウェルプレートなど）
 - ⑦ ボルテックスミキサー
 - ⑧ 卓上遠心機（スピンドアウン用）
 - ⑨ Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA)（製品コードRC351A、別売）
 - ⑩ Takara インターナルコントロール (RNaseP) DNA（製品コードRC353A/RC354A、別売）
2. リアルタイムPCR装置の設定
- 使用するリアルタイムPCR装置の手順書に従い、下記のとおり設定する。

① 検出波長

検出対象遺伝子	蛍光フィルター	クエンチャー
SARS-CoV-2	Cy5	なし
IC (内在性コントロール)	FAM	なし

② PCR反応液量

30 µL

③ PCRサイクル

ステップ	サイクル数	温度	反応時間	蛍光検出
1	1	52°C	5分	OFF
2	1	95°C	10秒	OFF
3	45	95°C	5秒	OFF
		60°C	30秒	ON

3. 前処理（核酸の簡易抽出）

- ① マイクロチューブに以下の混合液を調製する。

	1反応当り
1. 前処理液	4 µL
検体	16 µL

- ② サーマルサイクラーまたはヒートブロック（リッドヒーター付きのもの）等で95°C、5分の熱処理を行う。

※加熱処理後は、速やかにリアルタイムRT-PCR反応液に添加し、反応を開始してください。前処理済の溶液を一時保存する場合は氷上または4°Cで保存してください。

4. リアルタイムRT-PCR用マスターミックスの調製

- ① 以下の組成で、マスターミックスを氷上で調製する。調製量は、必要量（検体数+コントロール反応分）の1割増しとする。

	1反応当り
2. 反応液	15 µL
3. プライマー・プローブ液	3 µL
5. ROX Reference Dye II※1	0.6 µL

インターナルコントロール (RNaseP) DNA※2	1 µL
4. 滅菌水	4.4 µL

※1 ROX で蛍光強度の補正を行うリアルタイム PCR 装置を使用する場合に添加します。添加しない場合は、代わりに滅菌水を 0.6 µL 添加してください。

※2 検体に含まれるヒト核酸量が少ない場合に添加します。添加しない場合は、代わりに滅菌水を 1 µL 添加してください。

② リアルタイム PCR 用容器にマスターミックスを 24 µL ずつ分注する。

5. 測定試料およびコントロールの添加

① Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) に含まれる Positive Control RNA Mix を EASY Dilution (for Real Time PCR) で 100 倍希釈する。

※ Positive Control RNA Mix は氷上で取り扱ってください。

② 「3. 前処理 (核酸の簡易抽出)」を実施した測定試料を 6 µL 分取し、分注済のマスターミックスに添加する。

③ Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) に含まれる Negative Control を 6 µL 分取し、分注済のマスターミックスに添加する。

④ 100 倍希釈した Positive Control RNA Mix を 6 µL 分取し、分注済のマスターミックスに添加する。

6. 測定

「2. リアルタイム PCR 装置の設定」で設定した条件で測定を実施する。

7. データ解析

使用したリアルタイム PCR 装置の解析ソフトウェアの手順書に従い解析を実施し、Ct 値を算出する。

8. コントロール反応の判定

データ解析後、コントロール反応の結果が以下の条件を満たすことを確認する。条件を満たさない場合は再測定を推奨する。

	SARS-CoV-2 (Cy5)	IC (FAM)
Negative Control	Ct > 40 または不検出	
Positive Control RNA Mix	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30

【測定結果の判定法】

1. 判定法

算出された Ct 値を用いて以下の判定表に従って陽性/陰性を判定します。

		SARS-CoV-2 (Cy5)	
		≤ 40	> 40 または不検出
IC (FAM)	≤ 40	陽性	陰性
	> 40 または不検出	陽性	別法での 再測定を推奨※

※IC (FAM) の Ct 値が 40 より大きい場合、検体量の不足や劣化または PCR 阻害の疑いがあります。RNA 精製を行う手法での再測定により判定することを推奨します。例えば、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」³⁾に記載された方法で RNA 精製を行った後、本品で「3. 前処理 (核酸の簡易抽出)」を実施せず、「5. 測定試料およびコントロールの添加」の②において、精製 RNA を 6 µL 分取し、分注済のマスターミックスに添加します。

2. 判定上の注意

① 本品のプライマー・プローブに該当する領域において SARS-CoV-2 の変異や欠損・挿入が生じた際には、検出できない場合があります。その他の原因で陰性判定となる可能性もありますので、本品で陰性と判定されても必ずしも SARS-CoV-2 の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状等と併せて担当医師が総合的に判断してください。

② PCR 反応阻害等により増幅曲線の形状に異常が生じた場合、解析ソフトウェアのアルゴリズムが対応できないケースが稀に発生します。ソフトウェアの Auto 機能で適切な解析ができない場合には、ソフトウェアの手順書に従い Manual で解析パラメータの設定を行ってください。

【臨床的意義】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、SARS コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) によって引き起こされるウイルス性呼吸器疾患で、2019 年 12 月に中国湖北省武漢市で発生して以降、世界各地に急速に広まり多数の感染者を出しています。感染拡大の防止には、早期診断が重要であり、SARS-CoV-2 の遺伝子を増幅する PCR 検査が実施されています。

本品は、リアルタイム RT-PCR 法により SARS-CoV-2 遺伝子を検出する体外診断用医薬品です。本品の特長は、簡易抽出法の採用により RNA 精製を不要とした点で、標準的な PCR 検査法に比べて検査時間が大幅に短縮されます。また、内在性コントロールを同時検出するため PCR 阻害による偽陰性判定を防止することができ、COVID-19 の診断補助に有用と考えられます。

【臨床性能試験成績】

鼻咽頭ぬぐい液 148 検体、鼻腔ぬぐい液 157 検体、唾液 155 検体の実検体を用いて、本品と国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」³⁾に記載された RNA 精製を行う手法との比較試験を行いました。その結果、鼻咽頭ぬぐい液検体では陽性一致率 92.3%、陰性一致率 100%、鼻腔ぬぐい液検体では陽性一致率 83.9%、陰性一致率 98.6%、唾液検体では陽性一致率 81.2%、陰性一致率 97.1%となりました。

なお、本試験で使用した鼻咽頭ぬぐい液には 5 コピー未満のものが 4 検体、10~50 コピーのものが 3 検体、50~100 コピーのものが 2 検体、100~200 コピーのものが 2 検体含まれます。鼻腔ぬぐい液には 5 コピー未満のものが 7 検体、10~50 コピーのものが 4 検体、50~100 コピーのものが 4 検体、100~200 コピーのものが 4 検体含まれます。唾液には 5 コピー未満のものが 10 検体、5~50 コピーのものが 9 検体、50~100 コピーのものが 6 検体、100~200 コピーのものが 4 検体含まれます。

鼻咽頭ぬぐい液		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	72	0	72
	陰性	6	70	76
	判定不能	0	0	0
計		78	70	148

陽性一致率 92.3% (72/78)、陰性一致率 100% (70/70)

鼻腔ぬぐい液		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	73	0	73
	陰性	14	69	83
	判定不能	0	1	1
計		87	70	157

陽性一致率 83.9% (73/87)、陰性一致率 98.6% (69/70)

唾液		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	69	2	71
	陰性	16	68	84
	判定不能	0	0	0
計		85	70	155

陽性一致率 81.2% (69/85)、陰性一致率 97.1% (68/70)

【性能】

1. 性能

① 感度

- Positive Control RNA Mix (各 50 copies/反応) をリアルタイム RT-PCR の鋳型として測定した場合、SARS-CoV-2 遺伝子が 40 サイクル以内に検出される。
- Positive Control RNA Mix (各 50 copies/反応) をリアルタイム RT-PCR の鋳型として測定した場合、内在性コントロール遺伝子が 40 サイクル以内に検出される。

② 正確性

- Positive Control RNA Mix (各 50 copies/反応) をリアルタイム RT-PCR の鋳型として測定した場合、陽性判定となる。

- ・ Negative Control をリアルタイム RT-PCR の鋳型として測定した場合、陰性判定となる。
- ③ 同時再現性
- ・ Positive Control RNA Mix (各 50 copies/反応) をリアルタイム RT-PCR の鋳型として 3 回測定した場合、すべて陽性判定となる。
- ・ Negative Control をリアルタイム RT-PCR の鋳型として 3 回測定した場合、すべて陰性判定となる。
- ④ 最小検出感度 (LoD)
- ・ Positive Control RNA Mix (各 5、50、500 copies/反応) をリアルタイム RT-PCR の鋳型として多重測定し、最小検出感度 (95%以上が陽性判定となる最小コピー数) を確認したところ 50 copies/反応であった。

2. 校正用基準物質

Negative Control (SARS-CoV-2 遺伝子および内在性コントロール遺伝子を含まない) ※

Positive Control RNA Mix (1×10^7 copies each/ μ L の SARS-CoV-2 遺伝子および内在性コントロール遺伝子を含む) ※

※Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) (タカラバイオ製、製品コード: RC351A) として別売しております。

【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 検体を取り扱う際には、ガウン、使い捨て手袋、マスク、ゴーグル等の個人用保護具を着用し、各施設のマニュアルやガイドライン等に従って、必要なバイオハザード対策を行ってください。
 - ② 本品の構成試薬には毒劇物は含まれていませんが、試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに流水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
 - ③ 試薬が皮膚や粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
2. 使用上の注意
 - ① 本品の貯蔵方法に従って保存し、有効期限内に使用してください。
 - ② 異なるロットの試薬を継ぎ足して使用しないでください。
 - ③ 開封後の試薬は、微生物等の汚染に注意してください。
 - ④ 試薬の凍結融解は 5 回までとしてください。
 - ⑤ リアルタイム PCR 用容器は使用するリアルタイム PCR 装置の推奨品を使用してください。
 - ⑥ RT-PCR 反応液をリアルタイム PCR 装置にセットする前に、リアルタイム PCR 容器が密閉されていることを確認し、スピンドウンして、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。
 - ⑦ 機器や器具類は、適切に点検・校正されたものを使用してください。
3. 廃棄上の注意
 - ① 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。
 - ② 検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121°C で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液等で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。
 - ③ PCR 増幅産物は、高圧蒸気滅菌処理は行わないでください。処理行くと PCR 増幅産物によるコンタミネーション発生の原因となります。反応後の容器を密閉したまま廃棄してください。
 - ④ 廃棄物の処理に際しては、廃棄物の処理および清掃に関する法律等に従ってください。
 - ⑤ 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、適切に分別してください。

【貯蔵方法・有効期限】

1. 貯蔵方法
 - −20°C 以下
2. 有効期間
 - 18 ヶ月 (使用期限は外装に記載されています)

【包装単位】

Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット 100 反応分/1000 反応分
(各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等 (キットの構成)】の項を参照してください)

【主要文献】

- 1) アメリカ疾病予防管理センター (CDC) 発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)
- 2) 新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等における精度管理マニュアル
- 3) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」

**【問い合わせ先】

タカラバイオ株式会社 体外診断用医薬品専用窓口
〒525-0058 滋賀県草津市野路東七丁目 4 番 38 号
TEL: 077-567-4963

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

タカラバイオ株式会社
〒525-0058 滋賀県草津市野路東七丁目 4 番 38 号

2408I