

緊急連載 「新型コロナウイルスと分析化学」

国内での一日のコロナウイルス新規感染者数の減少が続き、ウイルスと共存した新しい生活様式への移行が進んでいます。本誌では、コロナウイルスについて、正しく理解するために最小限必要となる基礎的知識を広く会員に提供する必要があると考え、8号より緊急連載記事を企画しました。本連載は、コロナウイルスの感染状況や感染拡大防止に関して、分析化学的視点に基づき、正しく解釈していただくことを目的としております。

この10号においては、感染の検査に使用されている遺伝子検査及び、抗原検査法の特徴および、偽陽性の要因となるキャリアオーバーコンタミネーションの原因とその対策例について紹介しています。会員皆様の理解の一助としていただければ幸いです。

新型コロナウイルスの PCR 検査～原理からピットホールとその対策まで～

川 上 大 輔

1 はじめに

2020年1月以降、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は世界各地で猛威を振るっており、世界中で1500万人以上の感染者や多くの死者が出ている。ワクチンや治療薬の開発が進められているが、いまだ終息の見込みは立っていない。新型コロナウイルスは、ウイルス自身の遺伝情報を（一本鎖）RNAとしてもつRNAウイルスの一種である。自律複製することはできず、ヒトの粘膜細胞などに付着し、入り込んで増殖することが知られている。増殖したウイルスは、感染者の飛沫（くしゃみ、咳やつばなど）と共に放出され、他の人がそのウイルスを口や鼻から吸い込むことで感染する（飛沫感染）。また、感染者の手を介してウイルスが付着した物を他の人が触り、その手で口や鼻などを触ることで粘膜からウイルスが入り込む接触感染によっても感染が広がっていくと考えられている¹⁾。これまでの調査から、感染者は味覚や嗅覚の異常、頭痛、発熱、咳や呼吸困難感といった症状を呈することがわかっている。中には無症状の感染者も存在し、このことが新型コロナウイルスの感染拡大を防ぐ難しさの要因の一つになっている。特に、基礎疾患を有する方や高齢者への感染を防ぐために、PCR検査をはじめとする検査数や検査体制の拡充が求められている。

現在、新型コロナウイルスの感染を調べる方法には、PCR検査を含む遺伝子検査をはじめ、抗原検査や抗体検査が挙げられる。遺伝子検査の中で最も汎用されているPCR検査は、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase

chain-reaction）を利用することで、ウイルス由来の遺伝子配列を100～1000万倍以上に増幅することができる極めて高感度な分析手法である。PCR反応により得られる増幅曲線の有無で陽性または陰性を判定することができる。厚生労働省の発表によると、2020年8月5日時点で、1日あたり最大52254件のPCR検査能力があると報告されている。

本稿では、新型コロナウイルスの検査法である抗原検査と遺伝子検査について紹介する。遺伝子検査では、特にPCR検査（正確には、RT-PCR法を用いた検査）の原理や検査手法について解説する。また、PCR検査のピットホールであり、偽陽性の原因の一つともいわれるキャリアオーバーコンタミネーション（以下、コンタミネーションという）とその対策例について、筆者らの経験から注意点を紹介する。

2 新型コロナウイルス感染症に関する検査について

新型コロナウイルスの感染有無を判断する検査として、2020年7月30日時点では抗原検査と遺伝子検査に保険が適用されている。表1に各種検査の特徴を示す。抗原検査は、日本において2020年5月13日に体外診断用医薬品として認可された検査法であり、2020年7月17日には唾液の使用も認められた。インフルエンザ検査キットのような簡便性と、約30分という短時間で結果を得ることができる迅速性が特徴である。検査結果を得るまでに時間を要するPCR検査と比べて、抗原検査のメリットは迅速性にあると米国食品医薬品局

(FDA) が声明を出している²⁾。しかしながら、遺伝子検査に比べ、検出に一定以上のウイルス量が必要である。そのため、無症状者に対する使用やスクリーニング目的での使用には適さないとされており、抗原検査の感度を十分理解した上で、医師が検査の必要性を判断することになっている³⁾。

一方、遺伝子検査には、PCR法とLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法の2種類が存在し、新型コロナ流行開始時から利用されている。どちらの方法も専用の測定機器等の設備が必要であり、抗原検査ほどの簡便性や迅速性は無いものの、高感度であることから必須の検査法とされている。

表1 抗原検査と遺伝子検査の特徴

	抗原検査	遺伝子検査
方法	イムノクロマト グラフィー法	PCR法, LAMP法ほか
検体	鼻咽頭ぬぐい液 唾液	鼻咽頭ぬぐい液 唾液
検出対象	ウイルスの タンパク質 (抗原)	ウイルスの 遺伝子配列
検査時間	約30分	1~5時間 (前処理時間含)
検出に必要な ウイルス量 (目安)	1000 コピー/テスト	10 コピー/テスト ^{a)}
設備	測定機器は不要	リアルタイム PCR 装置, 核酸抽出, 精製キットなど

^{a)} PCR法の場合を記載

3 遺伝子検査とPCR法の原理

表2に示すように、PCR法には2種類の手法がある。一方は国立感染症研究所が作成した病原体検出マニュアル (感染研マニュアル)⁴⁾に基づく方法 (以下、感染研法という) であり、もう一方はRNAの精製が不要で、検体から直接ウイルスRNAの逆転写とリアルタイムPCRを同時に行うことができる方法 (検体直接PCR法) である。いずれのPCR法も、ウイルスRNAから逆転写した相補鎖DNA (cDNA) を鋳型とし、加水分解プローブを用いたリアルタイムRT-PCR (reverse transcription-PCR) 法を採用している。加水分解プローブ法は、5'末端に蛍光色素としてリポータ色素 (R)、3'末端に消光剤としてクエンチャー (Q) でラベル化した20~30merのオリゴヌクレオチドを使用する方法である (図1)。プローブがインタクトな状態では、リポータ色素はクエンチャーとのFRET (fluorescence resonance energy transfer, 蛍光共鳴エネルギー移動) により消光されるため、蛍光が抑制されている (図1-①)。次に、プローブがウイルスRNAから逆転写されたウイルス由来のcDNAとハイブリダイズする (図1-②)。その後、プライマーによる伸長反応 (PCR反応) が進む際に、プローブがTaq DNAポリメラーゼによる加水分解を受けるため、リポータ色素がプローブから遊離し蛍光を発する (図1-③)。プローブのハイブリダイズとPCR反応を45サイクル繰り返すと、PCR産物の量に比例して遊離のリポータ色素量が増すため、蛍光強度をモニタリングすることで、対象となる遺伝子配列の増殖曲線をリアルタイムで作製できる⁵⁾。感染研法、検体直接PCR法とも45サイクル以内に増幅曲線

表2 遺伝子検査法 (PCR法とLAMP法) の特徴

	PCR法		LAMP法
	感染研法 ^{a)}	検体直接PCR法	—
ウイルスRNAの抽出精製 (前処理)	必要	不要	必要
前処理含む検査時間	2.5~5時間	約1時間	約35分~1時間
検出に必要なウイルス量 (目安)	10 コピー/反応		100 コピー/反応
必要な測定機器	2色または3色同時検出可能なリアルタイムPCR装置		リアルタイム濁度測定装置
測定機器1台当たり、1度に処理できる検体数	96検体		16検体
長所	ウイルスRNAの精製を行うため、PCR反応の阻害を受けにくく、偽陽性のリスクが低い	RNAの精製工程が不要なため簡便	測定時間が短い (約35分) 陽性の場合、目視でも反応液が混濁していることを確認できる
短所	煩雑な前処理が必要であり、熟練した人材が必要	検体中の夾雑物によるPCR反応阻害を受けるリスク (偽陽性) がある	煩雑な前処理が必要。感度がRT-PCR法に劣る

^{a)} 国立感染症研究所の病原体検出マニュアル2019-nCoVに記載されている方法 (感染研法)

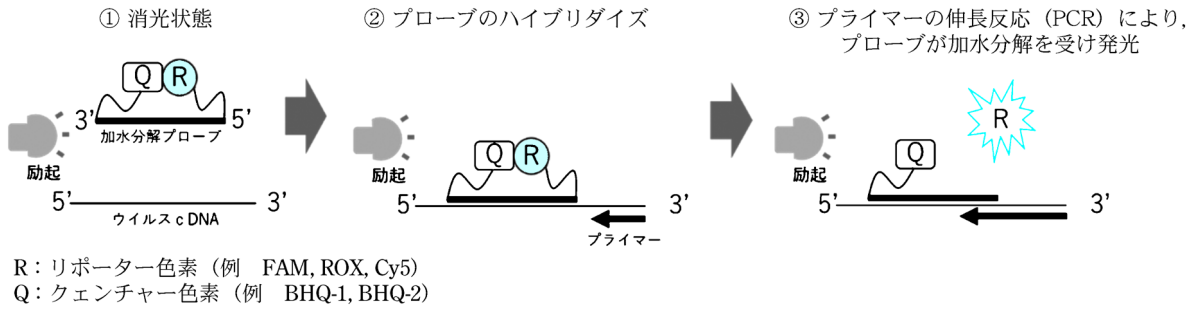


図 1 加水分解プローブ法の原理

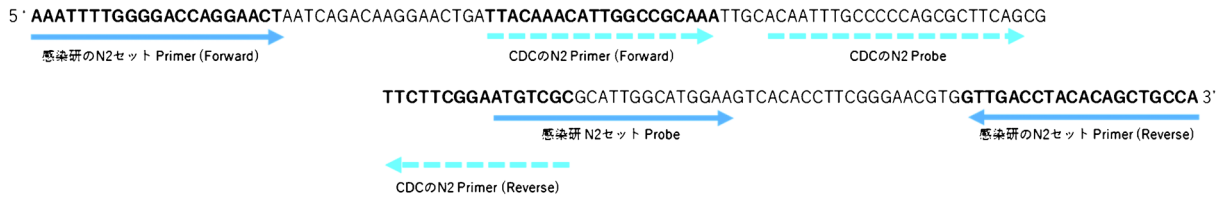
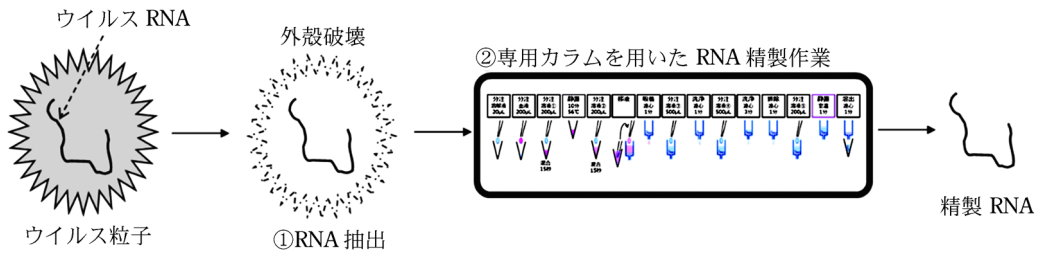


図 2 CDC の N2 と感染研の N2 セットのプライマーとプローブの位置関係

A) ウイルス RNA 抽出・精製工程



B) RT-PCR 工程

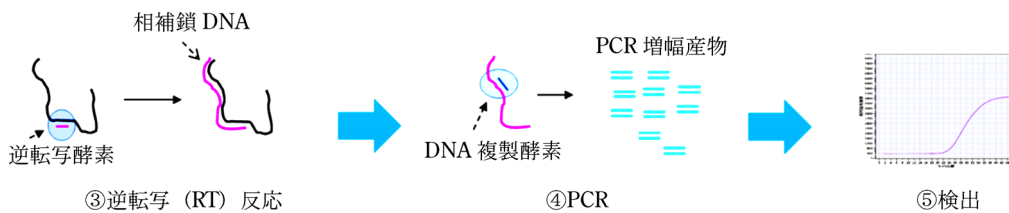


図 3 ウイルス RNA の抽出・精製から RT-PCR までの流れ

が確認されたものを陽性と判定することとなっている。
次に、感染研法と検体直接 PCR 法の違いについて述べる。まず、両手法間では、ターゲットとなる増幅箇所が異なっている。感染研法では、NセットとN2セットと呼ばれる新型コロナウイルス特異的な2か所の配列を増幅して検出する。一方で検体直接 PCR 法は、弊社も含め3社(タカラバイオ㈱, 東洋紡㈱および㈱島津製作所)ともアメリカ疾病予防管理センター (CDC) で定められた N1 および N2 とよばれる新型コロナウイルス特異的な2か所の配列をプライマー・プローブとして採用している。NセットとN1は増幅箇所が異なる

が、N2の増幅箇所は、図2に示すようにN2セットの内側に位置している。
両方の手法において根本的な違いは前処理工程である。感染研法では、試料(鼻咽喉頭ぬぐい液や唾液)採取後に専用キット(例 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN))を使用し、30分ほどかけて RNA の抽出および精製を行う必要がある(図3)。検体数が多い場合は、更に多くの時間を要する。抽出および精製工程は、作業者の習熟度が結果に影響を及ぼす可能性が高い。新型コロナウイルスとは別の事例ではあるが、ピペッタ操作に不慣れた学生を含む複数の実験者が、それぞれ同じサン

ブルから RNA の抽出と精製を行い、リアルタイム PCR を行ったところ、未習熟な学生数人により得られた増幅曲線の立ち上がりは想定よりも 5 サイクル程度遅れてしまった。これは、おそらく専用キットを用いた一連の抽出精製工程でサンプル RNA のロスが発生し、鋳型となる cDNA が少なくなってしまうことが原因と考えられる。新型コロナウイルスの PCR 検査において、ウイルス量が少ない場合は 40 サイクルあたりから増幅曲線が立ち上がる場合もある。そのため仮に、抽出精製工程において RNA のロスが発生すると、増幅曲線の立ち上がりが 5 サイクル遅れ、実際には陽性であるにもかかわらず、陰性と判定されてしまう事態が起こりうる。RNA の精製は PCR を阻害する夾雑物^{きょうざつ}を除去できるため、リアルタイム PCR を行う上でスタンダードな工程であるが、サンプルをロスしてしまうリスクがある点に注意が必要である。また、専用カラムを用いた抽出および精製工程の中では、容器を複数回新しいものに取り換えていくため、検体の取り換えやコンタミネーションのリスクが潜んでいることにも注意が必要である。

検体直接 PCR 法は、これら一連の RNA 精製作業が不要であり、検体から直接新型コロナウイルスを検出することができる方法である。検体には様々な夾雑物が含まれており、正電荷物質（ある種のタンパク質など）は鋳型（DNA/RNA）に、負電荷物質（ある種の糖、色素など）はポリメラーゼに吸着し、PCR 反応を阻害すると考えられている。PCR 反応を阻害するこれらの物質を除去するために、感染研法では RNA の精製作業を行うが、検体直接 PCR 法の試薬には、逆転写や PCR 反応を阻害する物質を中和し、不活化する技術が採用されているため、阻害物質共存下での逆転写や PCR 反応が可能となる。このように、検体直接 PCR 法は、一連の前処理工程を省くことができ、操作者の負担を大幅に軽減できる。また、容器の取り換え回数もほとんどないため、検体の取り換えのリスクも低い。しかしながら、検体直接 PCR 法にも注意すべき点がある。PCR 阻害を防ぐ物質を添加しているものの、検体に含まれる様々な夾雑物質により、PCR 反応が阻害されるリスクはゼロにはできない。よって、PCR 反応が正しく進まず、増幅曲線が立ち上がらない状態、つまり偽陰性の発生リスクがある。対策として、例えば、弊社の「2019 新型コロナウイルス検出試薬キット」の場合、PCR 反応液中に内部コントロール（IC）として人工合成 DNA とそのプライマーおよびプローブを添加している。PCR 反応が正しく進めば陽性・陰性にかかわらず、IC の増幅曲線を全ウェルで確認することができる。つまり、N1 や N2 遺伝子が増幅せず IC のみ増幅した場合、陰性と判断することができる。一方で、IC 含めてシグナルがまったく検出されない場合は、PCR 反応に何か不具合が生じた（判定不能、検査不成立）と判断でき、再検査

することを推奨している。なお、N1、N2 遺伝子を優先して増幅させるため、新型コロナウイルスのウイルス量が多い陽性検体では PCR 酵素が N1、N2 に消費されることから、IC が検出されない場合があるが、N1、N2 の増幅曲線を確認することができるため問題とはならない。以上のように、それぞれの PCR 法でどのようなリスクがあるか理解した上で、十分注意しながら作業をお願いしたい。

PCR 法以外にも、遺伝子検査として LAMP 法が検査に用いられている。1 台あたり 1 度に最大 16 検体処理できるリアルタイム濁度測定装置を用いる方法であり、等温増幅（60～65℃）により新型コロナウイルスの検出を行うことができる。また、LAMP 法は測定後に白濁による増幅の有無を目視確認することができる。ただし、感染研法（PCR 法）同様、RNA の抽出および精製作業が必要である。LAMP 法の増幅原理は少々複雑なため、詳細について参考文献⁶⁾または栄研化学㈱のゲノムサイト（<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/principle.html>）を確認頂きたい。LAMP 法の有用性について、北川らの症例報告によると、感度は 100 コピー/反応であり、RT-PCR（従来法）にて検査を実施した 76 例（陽性 30 例、陰性 46 例）に対する LAMP 法の一致率は 97.4 %（74/76）と良好な結果であった⁷⁾。このように、1 台で 1 度に処理できる検体数は RT-PCR 法に比べ少ないものの、測定時間が約 35 分と短いことから、LAMP 法を病院内での迅速検査として使用している施設は多いと思われる。

検体採取に関して、患者の鼻咽頭からスワブで検体を採取する際に、くしゃみなどによる医療従事者への飛沫感染のリスクが問題となっている。そこで、発症から 9 日以内に限られるものの、飛沫感染のリスクが低い唾液を検体とする遺伝子検査が保険適用となった。厚生労働科学研究の結果として、唾液検体に対する、各種遺伝子検査法の評価結果が報告されているので紹介する⁸⁾。この研究では、唾液を用いた PCR 検査が新型コロナウイルス感染症（COVID-19）患者の診断に適用可能であることを実証している。検証方法として、自衛隊中央病院に入院した COVID-19 感染患者の凍結唾液検体（発症後 14 日以内に採取された 88 症例）を用いて、PCR 法（感染研法）、検体直接 PCR 法、LAMP 法で測定し、鼻咽頭ぬぐい液を用いた PCR 検査結果との一致率を検証した。結果として、感染研法の一致率 84.1 %（74/88）であるのに対し、検体直接 PCR 法は一致率が最も高いキットで 81.8 %（72/88）、LAMP 法が 72.7 %（64/88）であった。

4 キャリーオーバーコンタミネーションと対策方法について

PCR 法は、原理的に 1 個の鋳型 DNA から 100～

1000 万倍以上に増幅することが可能な技術である。これは裏を返せば、本来陰性であるべき検体の中に、鋳型となるウイルスの遺伝子や PCR 増幅産物が微量（1 コピー）でも混入（コンタミネーション）してしまうと、リアルタイム PCR により増幅曲線が立ち上がってしまう。つまり、偽陽性となる可能性が潜んでいることを意味する。筆者らは、これまで新型コロナウイルス検出試薬キットのほか、ノロウイルス検出試薬キットをご採用頂いた多くの施設でコンタミネーションの発生の要因解析とその解決策に関するサポートを行ってきた。一般に、PCR 産物が空气中に拡散し（エアロゾル説）、部屋全体（壁や床など）がうっすら PCR 産物でコーティングされている、または、エアコンの吹き出し口やフィルタに溜まっていることがコンタミネーションの原因として指摘されている。以降、コンタミネーションの原因と考え

られる PCR 産物のことをコンタミネーション DNA という。コンタミネーションと疑われる事象が発生した際は、ピペッタや作業台など作業環境を中心に洗浄を試みるが、実際には、コンタミネーションを完全に解決できないことがほとんどである。

では、実際の汚染箇所はどこなのだろうか？ 筆者らの実験室でもコンタミネーションを経験しており、原因調査のため筆者らが実施したコンタミネーション DNA の調べ方を図 4 に示す。10 μ L の DW（distilled water）を調べたい箇所に数回ピペティングしたものをサンプルとする。このサンプルを、調べたいプライマーおよびプローブを含むネガティブコントロールに添加し、リアルタイム測定を行う。増幅すれば、コンタミネーション DNA が存在すると考えられる。筆者らの実験室で確認した結果、一般にコンタミネーションの原因として想定

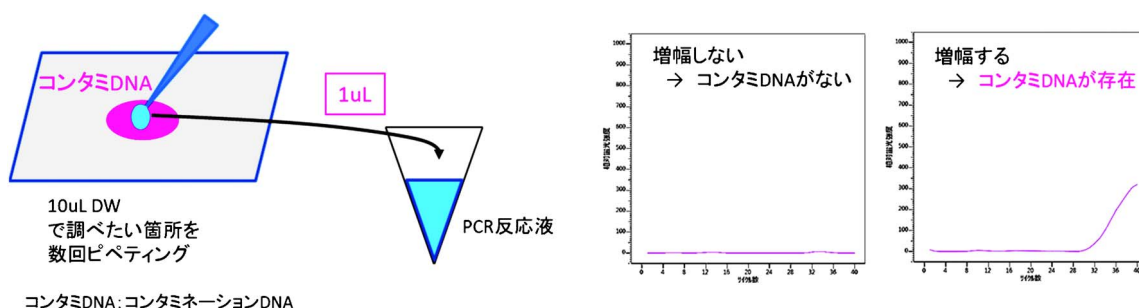


図 4 コンタミネーションの調べ方

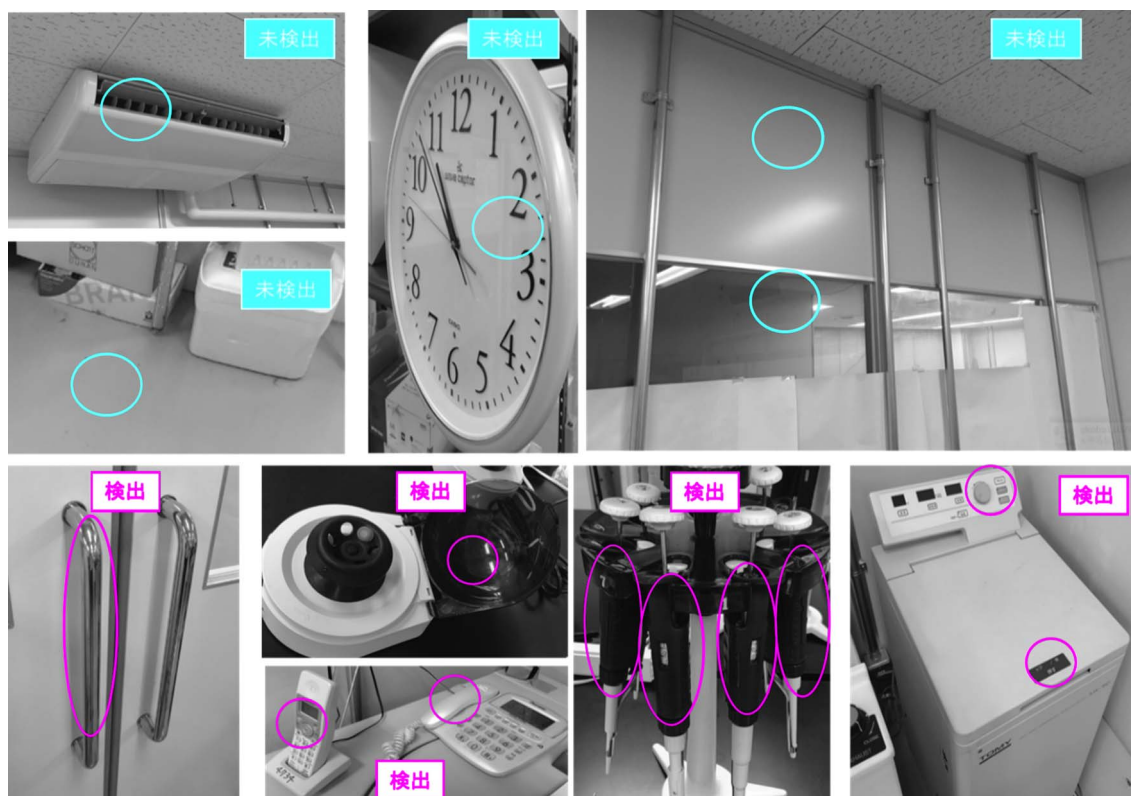


図 5 コンタミネーション DNA の検出箇所と未検出箇所

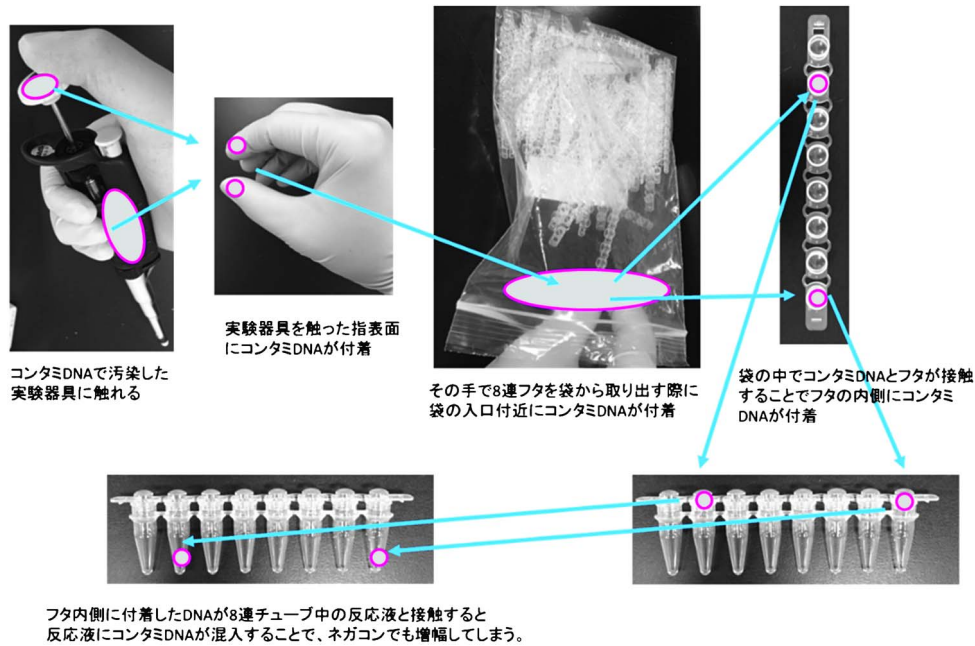
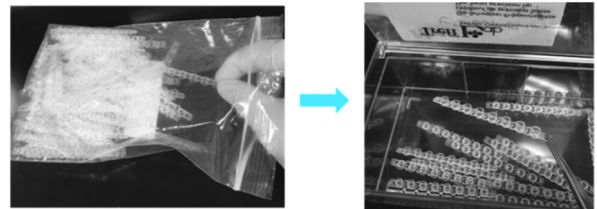


図 6 キャリーオーバーコンタミネーション事例

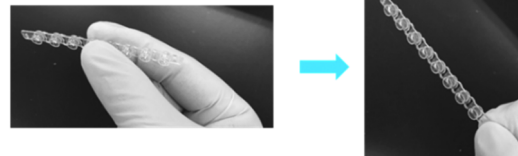
されるエアコンの吹き出し口、床や壁からは検出されず、むしろドアノブ、ピペッタや遠心機のボタンや受話器など、よく手で触れる部分から検出された（図5）。実際のお客様の事例として、パソコンの Enter キーからは検出されたが、F1 キーからは検出されないケースや、同フロアの最も遠い場所にあるエレベータのボタンから検出されるケースもあった。つまり、空気中に浮遊しているものが、反応液に落下することでコンタミネーションが発生してしまうのではなく、作業者の手を介して、多くの箇所に拡がっていると考えられる。今一度作業を振り返ってみる。ゴム手袋は綺麗なので大丈夫と思ってしまいが、実はゴム手袋をつけてドアやピペッタ等の汚染箇所に触れ、そのまま PCR チューブの裏蓋に触れた場合、コンタミネーション DNA が混入する可能性は極めて高い（図6）。

次に、コンタミネーション DNA の混入を防ぐ対策例について紹介する。まず、接触混入を防止するため、図7に示すように PCR チューブやプレートとその蓋、反応液調製用の 1.5 mL チューブを取り出す際は、必ずピンセットで取り出すようにする。また、チップ BOX は新品を使用する方が望ましい。次に、最も気を付けて頂きたい点として、検査後の PCR チューブやプレートの蓋は絶対に開けず、そのまま廃棄して頂きたい。特に電気泳動装置が設置している部屋では PCR チューブの蓋の開閉が行われるため、同室への入室後は手袋を交換するなど注意を払って頂きたい。逆転写酵素を含まないリアルタイム PCR 測定においても、コンタミネーション DNA は検出されていることから、筆者らは検査に用いられる陽性コントロール RNA や新型コロナウイルスが

8 連チューブ蓋はピンセットで取り出す



8 連チューブ蓋は端を掴む



チップ BOX は新品を使用する

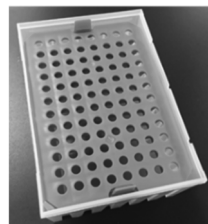


図 7 キャリーオーバーコンタミネーションの対策例

コンタミネーションの原因である可能性は低いと考えている。最後に、コンタミネーションの発生時や日頃の清掃を行う際のお願として、接触する部分を中心に必ず次亜塩素酸溶液を用いて入念にふき取ることを徹底して頂きたい。注意点として、実験室でよく用いられている 70 % エタノールなどのアルコール類は、DNA を分解しないので使用しないこと。

5 むすび

新型コロナウイルスで使用されている検査の種類やその特徴および、検査を行う上で特に注意すべきキャリアオーバーコンタミネーションの原因とその対策例を中心に紹介した。当面、検査数は増加の一途をたどることが予想されており、検査に携わる医療従事者の方々の負担は極めて大きいものと思われる。そのような状況の中で、本稿が特にキャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性の発生リスク低減の一助となればそれほど嬉しいことはない。筆者らは分析機器メーカーとして、作業者の負担軽減のため、検体直接 PCR 法の試薬開発を行ってきた。今後も負担が少なく、かつ精度の高い測定系の開発に努めていきたい。

*QIAamp は、Qiagen Group の商標です。

文 献

- 1) 厚生労働省：新型コロナウイルスに関する Q&A（一般の方向け）, (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/dengue_fever_qa_00001.html#Q2-1), (2020年6月30日, 最終確認).
- 2) The U.S. Food and Drug Administration: Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Antigen Test to Help in the Rapid Detection of the Virus that Causes COVID-19 in Patients (2020年5月9日).
- 3) 厚生労働省：SARS-Cov-2 抗原検出用キットの活用に関するガイドライン, (<https://www.mhlw.go.jp/content/000640554.pdf>), (2020年7月20日, 最終確認).
- 4) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 (令和2年3月19日), (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) (2020年7月20日, 最終確認).
- 5) 西岡真輔, 河野隆志：ここまでできる PCR 最新活用マニュアル, p. 154-159, (羊土社), (2003).
- 6) 牛久保宏：ウイルス, **54**, p. 107 (2004).
- 7) 北川裕太郎, 折原悠太, 川村利江子, 小棚雅寛, 河村亨, 松岡 優, 酒井 純, 今井一男, 樽本憲人, 武内信一, 前崎繁文, 前田卓哉：SARS-CoV-2 診断における LAMP 法の有用性, (http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_casereport_200414_1.pdf), (2020年7月28日, 最終確認).
- 8) 厚生労働省：唾液を用いた PCR 検査に係る厚生労働科学研究の結果について, (<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000635988.pdf>), (2020年6月30日参照).



川上大輔 (Daisuke KAWAKAMI)
株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部バイオ・臨床ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1)。大阪大学大学院医学系研究科修士課程。修士 (医科学)。《趣味》音楽鑑賞, 楽器演奏(ギター, バイオリン)。

新刊紹介

フロンティア機能高分子金属錯体

西原 寛, 山元公寿 編著

高分子金属錯体を1つの新しい物質群とする概念が1970年代に始まり、半世紀が経過する。当初は、構造決定が難しく、研究対象として扱いにくい面もあったといわれるが、現在では、材料科学から医療まで、幅広い分野での研究が進められている。分析化学においては、ポルフィリン、シクロデキストリン、クラウンエーテルなどを含む高分子金属錯体をよく目にするであろう。本書では、1章で高分子金属錯体のあゆみ、分

類、特徴と機能、2章で精密高分子錯体の構造とその合成法がまとめられている。3から5章では、生体機能高分子錯体、材料用途で広がりをもせる光電磁機能や触媒・分離機能を有する多くの錯体、それらの研究事例が紹介されている。これらの引用には比較的新しい論文が多く含まれ、錯体の構造を表した図や合成ルートや反応過程を示した式がふんだんに掲載されている。高分子金属錯体を機能別に網羅した本書は、高分子金属錯体を利用する分析法の開発、高分子金属錯体を用いる材料の構造決定や物性評価など、既に研究対象として扱われている方、新たにこの分野での研究を考えている方にとって強い味方になるであろう。

(ISBN 978-4-7827-0791-3・A5判・550ページ・8,000円+税・2020年刊・三共出版)