

昨年末に世界で最初の患者が中国武漢市で報告された新型コロナウイルス（COVID-19）は、約半年後の今では毎日約20万人の新規感染者が報告され、総感染者数は1230万人（7月10日現在）を超えています。そのため、私たちの生活は、3密を避けた「新しい生活様式」への移行が進んでいます。人類は、これまでにいくつもの感染症に遭遇し、その都度、病原性ウイルスと共存するために必要な知識、技術などを見出しており、今回の新型コロナウイルスに対しても、PCR検査や新型コロナワクチン等によって、共存体制を整え始めています。一方、新型コロナウイルスの感染検査は、検査結果が個人の行動や感染拡大防止に大きな影響を及ぼします。つまり、検査結果が持つ意味について、分析化学の見地から適切に把握し、正確な理解を促すことが重要です。また、現状の検査法は、信頼性、簡便性、安全性などの面で社会の要求を十分に満たしているとは言い難いのが事実であると共に、そのような現状を打破する試みも始まっています。このような事態に鑑みて、「ぶんせき」編集委員会では、新型コロナウイルスやその分析法の現状や新たな試みを広く会員に提供することで、会員の皆さまによるコロナ感染拡大の防止や「新しい生活様式」への適応について、少しでも役立つものを提供できればと企画するものであります。

まず、本号においては、日々の報道によって今では最も有名な検査法であるといっても過言ではないPCR法について紹介します。記事では、PCR法の原理に加え、新型コロナウイルスや臨床検査用語のように、コロナウイルスを分析する際に必要な基礎的な知識の提供を目的にしています。

今後、新型コロナウイルスの分析法や数理モデルを用いた感染拡大の防止などの企画を進めて参ります。会員の皆様の理解の一助としていただければ幸いです。

〔「ぶんせき」編集委員会〕

## 新型コロナウイルス PCR 検査の現状

島津光伸

### 1 概要

2019年12月末、中国湖北省武漢で原因不明のウイルス性肺炎が発生し、僅か1か月後には、起因ウイルス塩基配列が決定され、29844 bp、1本鎖RNAを持つ、新型コロナウイルスであると同定された。そして、後にこの新型コロナウイルスが世界的に拡散し、パンデミックを引き起こし、多くの死者を出し、経済的にも大きな打撃を与え続けている。日本では2020年2月3日に寄港したダイヤモンドプリンセス号の乗員乗客3711人の内で集団発生が報じられたのが始まりである。

また、2020年2月1日厚生労働省より、感染症法に基づきこの新型コロナウイルスが指定感染症とされた。同年4月7日には安倍首相より、初の緊急事態宣言が発出され、我々の日常は大きく変化し、新たな生活様式が始まることになった。そして、新型コロナウイルスに関する情報が連日提供され、3密、ソーシャルディスタ

ンス、テレワーク、PCR検査といった様々な言葉が一般的に用いられるようになった。その中でも「PCR検査」という言葉は、今では広く社会に浸透している。本稿では新型コロナウイルス感染拡大の背景を含め、PCR検査について、検体搬送・搬入、検査工程、結果判定、検査報告までの検査工程と検査を通じて得た知見を概説する。

### 2 背景

2019年12月末、中国湖北省武漢で病原体不明のウイルス性肺炎が発生し、その後新型コロナウイルスであることが分かり、2019 novel coronavirus (2019-nCoV) と命名された。2020年1月26日時点で2000人以上に感染が認められ、そのほとんどが武漢の住人、訪問者であり、人から人への感染も確認された<sup>1)</sup>。

日本では、新しい感染症が発生した場合、感染症法に従うことになる。感染症法は感染症患者の人権を尊重

し、適切な医療を提供することで、蔓延を適確に防止するためのものである。感染症は重篤性に基づいて第一類感染症から第五類感染症に分類され、届出の可否・方法、入院勧告の可否、就業制限通知の可否等の対応が定められている。今回の新型コロナウイルスで指定された指定感染症は、第一から第三類及び新型インフルエンザ等の感染症に分類されない既知の感染症の中で第一から第三類に準じた対応の必要が生じた感染症と定義されており、1年間の限定的な分類である。過去には鳥インフルエンザ H5N1 が指定感染症となり、現在では第二類に位置付けられている。指定感染症となると医師の保健所への届出義務が発生し、積極的疫学調査が始まる。検査に関する対応は、国立感染症研究所（感染研）の主導となる。感染研では、中国疾病対策センター、世界保健機構等から情報提供を受け共有化して、検体の取り扱いと検査法などを定めていく。感染研は2020年1月20日に高感度で検出できるコンベンショナル PCR 法を、1月24日に現在の方法であるリアルタイム PCR 法を完成させ、1月29日に全国約80か所の地方公共団体の衛生研究所や検疫所にリアルタイム PCR 方法とその試薬等を提供した。これにより、本邦の本感染症に対する公衆衛生対策のための検査体制が本格的に整備された。

その後、検査数の大幅な増加が見込まれることから、1月末に厚生労働省より臨床検査センター各社に新型コロナウイルスの PCR 検査に関する打診があった。当社は、2月17日から新型コロナウイルス PCR 検査受託を開始している。

### 3 コロナウイルス

コロナウイルスは、いわゆる、冬季風邪のウイルスである。軽症の風邪様症状の10~30%の起病因原体とされている。ヒトが普通に冬季感染するコロナウイルスは4種（HCoV-229E（ $\alpha$ ）、HCoV-OC43（ $\beta$ ）、HCoV-NL63（ $\alpha$ ）、HCoV-HKU1（ $\beta$ ））が知られている。

また、動物との接触から感染し、重症肺炎を引き起こすウイルスとして、SARS-CoV、MERS-CoVの2種が知られている。すなわち、今回の新型コロナウイルスはヒトに感染する7番目のコロナウイルスとなる。2002年 SARS-CoV が発生するまでは、コロナウイルスに感染してもあまり重篤にならず、治療する薬剤もないことから、臨床検査として起病因ウイルスを判定する必要性・有用性がなかった。

現在世界中に蔓延し、パンデミックとなっている新型コロナウイルスの PCR 検査に関して言及する前に、これまでに人に重症肺炎を起こした SARS-CoV（2002年末）、MERS-CoV（2012年）について、これらの感染が発生した地域と発生しなかった地域の経験値の差が現在よく比較されていることから、感染研ホームページ記載内容から抜粋して引用する。

#### 3・1 重症急性呼吸器症候群（SARS: severe acute respiratory syndrome）<sup>2)</sup>

2002年11月中国南部の広東省を起源とした重篤な非定型性肺炎が発生し、その後北半球のインド東のアジア（ベトナム、香港、台湾など）とカナダを中心に、32の地域や国々へ感染が拡大した。2003年3月12日に WHO は、全世界に向けて異型肺炎の流行に関する注意喚起（Global Alert）を発し、本格的調査を開始した。異型肺炎は重症急性呼吸器症候群（SARS: severe acute respiratory syndrome）と呼ばれ、WHO 加盟国が起病因原体特定に取り組んだ結果、新型コロナウイルス {SARS コロナウイルス (SARS-CoV)} による感染が肺炎の原因であることが判明した。現在、SARS-CoV はコウモリが保有していたウイルスがヒトに感染し重症肺炎を引き起こしたと考えられている。

集団発生の可能性は、医療施設、介護施設などヒト-ヒトの接触が密な場合に高いことが確認され、「隔離と検査」対策により収束が図られた。2003年7月5日に WHO により終息宣言が発信され、8000人を超える症例と700名以上の死亡例が報告された。

日本では、2003年4月に新感染症として取り扱うことが決められ、7月には指定感染症に指定され、2003年11月5日より感染症法の改正に伴い、第二類感染症としての報告が義務化されている。これまでに、集団発生期間中に報告された可能性例16例と疑い例52例のすべてが SARS の可能性を否定されており、日本での感染例は無いとされている。当社では、SARS 疑い患者の臨床検体が提出された場合を想定した訓練を実施したが準備するに留まった。

#### 3・2 中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）<sup>3)</sup>

MERS-CoV の感染例は2012年にサウジアラビアで発見された。ヨーロッパ地域にも感染が拡大し、27か国で2494人の感染者が WHO へ報告され（2019年11月30日時点）、そのうち858人が死亡した（致命率34.4%）。ヒトコブラクダに風邪症状を引き起こすウイルスが、種の壁を超えてヒトに感染したことで重症肺炎を引き起こしたと考えられている。

感染は病院内や家庭内において重症者からの飛沫<sup>ひまつ</sup>を介して起きており、市中感染は発生していない。2015年に韓国の病院で起こった感染拡大では、発症から隔離までに10日間を要し、この間に複数の医療機関を受診したことが感染を拡大させた。中東帰りの1人の感染者から186人へ<sup>でんぱ</sup>伝播した。韓国では、この経験が今回の感染制御に大いに活かされたものと考えられている。

### 4 ウイルス分類

コロナウイルスは、エンベロープを持つ一本鎖+鎖

表1 コロナウイルスの分類

B型肝炎ウイルス (HBV)	DNA	2本鎖	エンベロープあり
ヒトパピローマウイルス (HPV)	DNA	2本鎖	エンベロープなし
C型肝炎ウイルス (HCV)	RNA	1本鎖 (+鎖)	エンベロープあり
インフルエンザ (感冒)	RNA	1本鎖 (-鎖)	エンベロープあり
エボラウイルス (出血熱)	RNA	1本鎖 (-鎖)	エンベロープあり
ヒト免疫不全ウイルス (AIDS)	RNA	1本鎖 (+鎖)	エンベロープあり
ノロウイルス (胃腸炎, 下痢)	RNA	1本鎖 (+鎖)	エンベロープなし
コロナウイルス	RNA	1本鎖 (+鎖)	エンベロープあり

RNAウイルスである。ウイルスは、DNA、RNA、1本鎖、2本鎖 エンベロープ有無により分類されている。比較的良く知られているウイルスの分類を表1にまとめた。現在試されている抗ウイルス薬は、コロナウイルスと同じ1本鎖RNAウイルスであるエボラウイルス、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼを阻害する薬剤である。

コロナウイルスは、ニドウイルス目、コロナウイルス科、コロナウイルス亜科に分類される。コロナウイルス亜科は、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ の属に細分される。今回の新型コロナウイルスは $\beta$ コロナウイルスである。 $\beta$ コロナウイルスには四つの亜属 Embecovirus(エンベコウイルス), Sarbecovirus(サルベコウイルス), Merbecovirus(メルベコウイルス), Nobecovirus(ノベコウイルス)があり、SARS-CoVと新型コロナウイルスは、サルベコウイルスに属する。ちなみに、MERS-CoVはメルベコウイルスに属している。

## 5 臨床検査用語

臨床検査で使用されている単語は一般的な言葉のイメージとは異なっている。そこで、いくつかの言葉に対し、臨床検査での定義を紹介する。

### 5.1 感度と特異度

感度が良い、感度が悪いと漠然と使用されているが、臨床検査における感度とは、疾患がある人を検査で疾患あり、陽性と検出する確率 ( $a/a+c$ ) である (表2)。一方、特異度とは、疾患の無い人を検査で疾患無し、陰性と検出する確率 ( $d/b+d$ ) である。すべてを陽性とすれば感度100%となり、すべてを陰性とすれば、特異度100%となる。したがって、感度・特異度のバランスの取れた検査が良い検査とされている。さらに、陽性的中率は  $(a)/(a+b)$ 、陰性的中率は  $(c)/(c+d)$  で

表2 検査の感度と特異度

	疾患あり	疾患なし
検査結果 陽性	真陽性(a)	偽陽性(b)
検査結果 陰性	偽陰性(c)	真陰性(d)

表3 陽性的中率

	疾患あり	疾患なし
検査結果 陽性	99(a)	999(b)
検査結果 陰性	1(c)	98,901(d)
計	100(e)	99,900(f)

表される。感度と特異度を統合し、精度として  $(a+d)/(a+b+c+d)$  で表されることもある (表3)。

また、臨床検査では何らかの症状のある人に対して検査することが重要である。例として、1000人に1人の疾患に対して、感度99%、特異度99%で検査した時の陽性的中率 (検査で疾患ありの人を陽性として検出する確率) を計算した (表3)。1000人に1人に病気であることから、10万人に100人が疾患ありとなる。感度が99%であることから、99人が陽性となり、1人陰性となる。残る99900人は全員陰性であるが、特異度が99%であるため、999人が陽性となる。この場合、陽性的中率  $(a)/(a+b)$  は9%となる。検査が陽性であった時、本当に病気である確率は僅か9%である。これは、感度、特異度が高い良い検査でも、事前確率が重要となるケースである。そもそも患者さんである確率が低い場合、すなわち、病気ではない人、症状のない人を検査することの難しさ、注意事項でもある。

### 5.2 臨床検査精度管理

検査とはある基準に従って適否を調べることである。「ある基準」とは、誰が、どこで、どのような方法で実施するかである。「誰が」とは有資格者、訓練を受けた検査員であり、「どこで」とは、ISO (International Organization for Standardization, 国際標準化機構), CAP (College of American Pathologists, 米国病理学会) 等認定施設であり、検査を実施に足る設備、機器が整備されていることである。「どのような方法」とは十分な検証がなされ、再現性良く、真値を測定できる手順が定まっていることである。さらに、「検査」は検体採取から搬送、検査、結果の確定、報告の一連の工程を介した結果である。

通常、検査を開始する際には、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性が評価される。これらの評価は、ゲノム医療、いわゆる遺伝子検査の普及と共に重要度が増している。2018年12月に改正された医療法もゲノム医療の普及がその背景にあり、検体検査の精度の確保の

基準が設けられ、検体検査の分類の見直し、衛生検査所指導要領の見直しが行われた。これまでの検体検査分類が見直され、遺伝子関連検査染色体検査という新しい分類ができ、6分類から7分類に変更された。これまで、三つの分類に分散していた病原体遺伝子検査、ヒト遺伝子、染色体検査を一つにまとめ、新たな一次分類、遺伝子関連検査・染色体検査ができた。この新たな一次分類には、精度・品質管理の重要性から、これまで担当してきた精度管理責任者に加え、遺伝子関連検査・染色体検査精度の確保に係る責任者の配置が要求されている<sup>4)</sup>。遺伝子検査は分析的感度・特異度が高く、確定検査となる検査結果が出るものの、高度な技術力が要求され複雑な工程を経ることから精度管理が極めて重要であると認識されている。

通常、臨床検査では体外診断用医薬品（診断薬）と医療機器を用いて診断の一助となる検査データを取得する。診断薬が承認されるには、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性について、十分なデータの取得が前提となっている。したがって、新規な検査における診断薬の承認はハードルが高く、臨床性能試験が必須である。しかしながら、今回のコロナウイルスの検査試薬は、いずれもスピードが優先され、臨床性能試験は必ずしも十分とは言えない。

## 6 PCR 法原理

PCR とはポリメラーゼチェーンリアクションの略である。加熱により、1本鎖となった鋳型 DNA にプライマーが相補的に結合（アニーリング）し、これを起点に酵素（DNA ポリメラーゼ）反応が起こり、二つのプライマーに挟まれた領域が増幅する仕組みである（図 1A, B, C）。したがって、プライマーは特異的な塩基配列に結合することが必須条件となる。アニーリングは温度依存性であり、温度が高いとプライマーは結合し難く、乖離しやすいため特異性が向上する。一方、アニーリングの温度が低いとプライマーの非特異的な結合から DNA 合成が開始する。そのため、至適なアニーリング条件が重要となる。代表的反応条件を表 4 に示した。

現在の主流であるリアルタイム PCR 法は、DNA ポリメラーゼが DNA を合成する際にプローブが加水分解を受け蛍光を発することを利用する（図 2）。この蛍光量を PCR サイクルごとに測定することにより、遺伝子増幅の状況を検出できる。

あらかじめ遺伝子数を決めた標準物質の 10 倍希釈系列を鋳型としたリアルタイム PCR 実験例を図 3 に示した。PCR 法ではプライマーの結合効率が反応系全体の増幅効率を決定する。理想的には初発鋳型量 A に対し反応回数 N とすると  $A \times 2^N$  となる。実際の増幅効率は 2 ではないが、1.9 以上が反応系としては望ましい。PCR 法の増幅効率については、10 希釈系列を用いた実

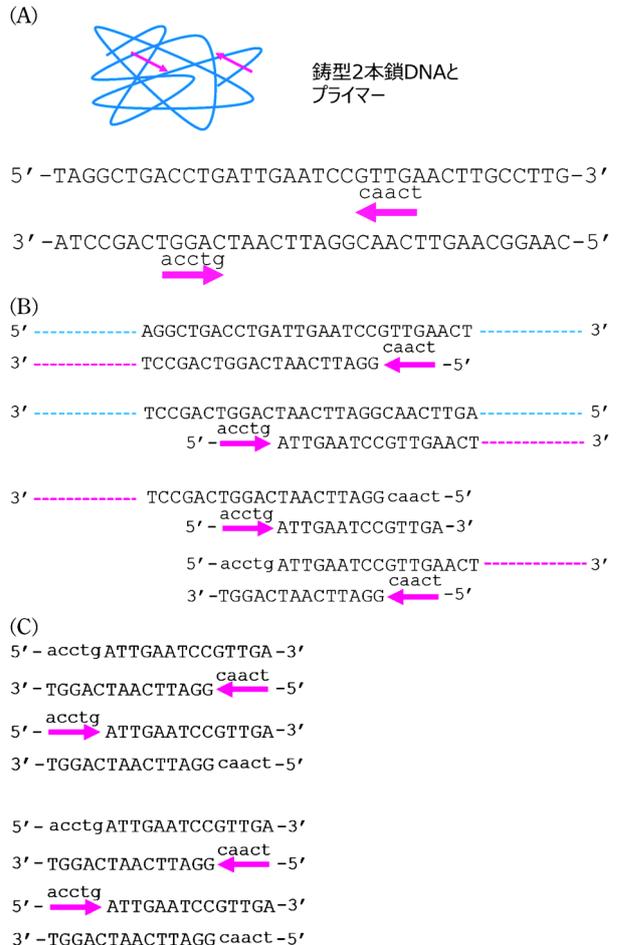


図 1 PCR 法原理 (A) 図では簡略化してプライマー（赤矢印）を 5 塩基としたが、通常は 15~22 塩基である。鋳型 DNA は反応系が 95 °C になると 2 本鎖 DNA 状態から 1 本鎖になり、特異的な塩基配列を持つプライマーが結合できる状態となる。プライマーは反応系が 55 °C に低下する間に特異的な場所に結合する。(B) プライマーからの DNA 合成は 5' から 3' の方向に行われる。(C) PCR サイクルを繰り返すことでプライマーに挟まれた領域が増幅する。

表 4 PCR 法反応条件と現象

温度	反応時間	回数（サイクル）	反応現象
95 °C	3 分間	1	2 本鎖 DNA が 1 本鎖になる
95 °C	30 秒間	35 (3 温調を繰り返す)	2 本鎖 DNA が 1 本鎖になる
55 °C	30 秒間		プライマーが配列特異的に結合する
72 °C	1 分間		酵素がプライマーを起点に DNA を合成する

験において、横軸に初発鋳型量、縦軸に一定の蛍光量になった時のサイクル数の関係から求められる（図 4）。

この方法の利点は、PCR 工程後の反応結果を検出する工程が無いことである。PCR 後の遺伝子増幅が行われた反応容器を開封せずに検出でき、遺伝子増幅産物によるコンタミネーションのリスクを無くしている。

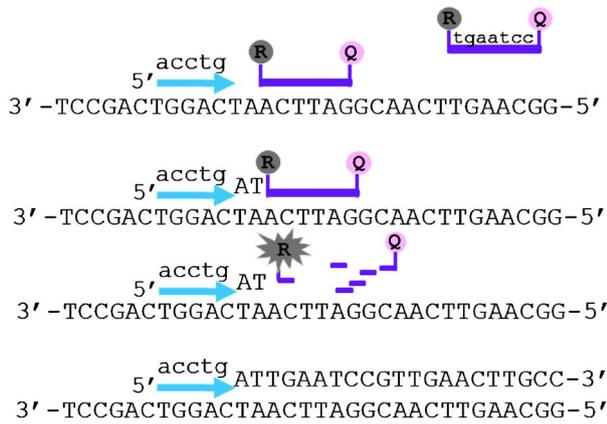


図2 リアルタイムPCR法（プローブ加水分解法）。図では、プライマー、プローブ簡略化して記載した。水色矢印：プライマーは通常15~22merである。紫色：プローブはプライマーより、Tm値を高くするために25mer程度にする。プローブはプライマーより先に結合する。DNAポリメラーゼは、先に結合しているプローブを加水分解して合成を進める。プローブは、R（レポーター）とQ（クエンチャー）が離れると蛍光を発するように設計されている。

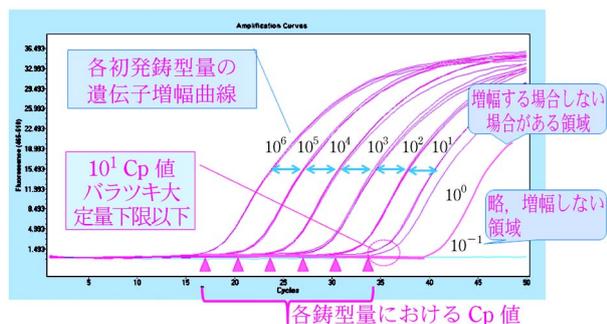
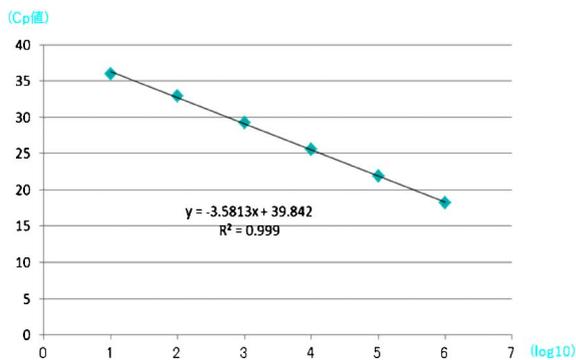


図3 リアルタイムPCR実験データ。10倍希釈系列（ $10^6 \sim 10^1$ ）の鋳型DNAを3重測定したリアルタイムPCRの実験結果を基に作成したモデル図。 $10^6 \sim 10^2$ の場合は3重測定のCp値は、ほぼ同じ（増幅曲線の立ち上がりが揃っている）であるが、 $10^1$ ではCp値が変動する。 $10^0$ では、反応系に鋳型を一定量加えることが難しくなり、増幅しない場合がある。



検量線の傾きからPCR増幅効率を求める  
 増幅効率： $10^{(-1/Slope)} - 1$  Slope（傾き）= $-3.5813$   
 増幅効率： $0.902$ （90.2%）  $10 = (1.902)^{3.5813}$

図4 リアルタイムPCR法検量線

## 7 PCR検査

PCR法は、他の増幅法を含め、臨床検査では核酸増幅検査としてまとめられている。検査対象物を増幅して検出する原理が、他の測定法にはない特徴である。この特徴が大きな長所でもあり、時として短所にもなる。

PCR検査を含む核酸増幅検査には偽陽性と偽陰性の問題がある。反応系に鋳型が存在すれば、確実に増幅可能であるが、反応系に鋳型を確実に入れることができるかの問題が発生する。例えば極めて希薄な溶液、 $1 \mu\text{L}$ に1コピー（1ウイルス）の場合、 $10 \mu\text{L}$ を分取しても、常に10コピー分取することはできない。すなわち病原体の少ない検体はこの問題に直面し、再現性の低い結果（偽陰性）となる（図3）。したがって、PCR検査は検体採取が最初の関門となる。偽陰性を回避するためには、適切な部位から適切に採取することが重要となる。今回の新型コロナウイルスPCR検査の場合、病原体が適切に採取できる時期・検査材料（鼻腔・咽頭拭い液、喀痰、唾液）について、いまだ不明な部分が多い。

一方、非常に高感度な検出系であることから偽陽性にも注意を払う必要がある。非常に病原体の多い検体では、1000倍以上希釈しても陽性として検出される。液量で例えると陰性検体1mLに陽性検体 $1 \mu\text{L}$ が、混入したら検査陽性となる。これを防ぐために検査員は様々な工夫と検査作法を守って検査を実施している。コンタミネーションを防止するには、ピペット操作、遠心分離などエアロゾルが発生する操作、人が関与する手工程に対し十分に注意することが重要である。

## 8 新型コロナウイルスPCR検査

当社で行われている新型コロナウイルス検査について、検査搬送から結果報告までの工程を紹介する。

### 8.1 検体搬送

検体採取後の保存液は、生理食塩水、ウイルス輸送培地である。保管期間も決まっており、鼻咽頭拭い液、下気道由来検体（喀痰、気管吸引液）は $4^\circ\text{C}$ 、48時間それ以上は $-80^\circ\text{C}$ で搬送することが感染研より推奨されている。当社では、上記保存液の他に最近診断薬承認されたコバスSARS-CoV-2試薬の保存液として、ウイルスの生物活性が失活する塩酸グアニジンが含まれているコバスPCRメディアも利用している。この保存液では、外来性のRNA分解酵素も失活する。

検体を採取した綿棒（スワブ）は保存液が入っている容器に入れられる。新型コロナウイルスは指定感染症であることから、カテゴリーB輸送、三重梱包となる。当社では、バリアパウチ、バリアボックスを使用している。スワブが入った容器（一重）これを吸収シートで包み、バリアパウチ（密閉パウチ袋、二重目）に入れ密閉

する。さらに、これをバリアボックス（耐水性、堅牢性に優れた箱、三重目）に入れる。実際はこのバリアボックスを社有の輸送ボックス（オーバーパック）に入れ搬送している。

## 8・2 検体搬入

新型コロナウイルス感染疑い患者由来の臨床検体は、バイオセーフティレベル2（BSL2）での取り扱いが感染研所内ルールとして決定され発信された。

当社では、バリアボックスを用いて検体を検査室に直接搬入する。バリアパウチは、安全キャビネットの中で開封する。その時には、N95マスク、手袋、保護メガネ、フェイスシールド、白衣の上にガウンを着て対応する。安全キャビネット内で検体に漏洩がないかを確認し、チューブの外側を1本ずつアルコール除染する。この一連の作業は、コロナウイルスPCR検査検体だけでなく、コロナウイルス罹患者のすべての臨床検体について実施している。つまり、コロナウイルス罹患者の血液検体なども三重梱包で搬送している。この検体の確認と除染行為は検査員へのリスクを低減させる工程として実施している。除染された検体は、検査依頼情報と照合され、検査に必須なバーコードラベルが貼付される。通常の臨床検体は、検体受入れ部署で検体仕分け・照合作業を検体の搬入と共に夜間実施し、効率的な検査をしているが、指定感染症の新型コロナウイルスに関する臨床検査は上記特別な工程を追加し実施している。

## 8・3 核酸抽出前処理

現在は核酸抽出からPCR、結果解析までが全自動となった試薬・機器、コバスSARS-CoV-2が導入されているが、ここでは当社が最初に実施した検査工程を説明する。

スワブが入った検体を安全キャビネット内で開栓し、検査に必要な液量を分注する。分注するチューブには、あらかじめ検査の精度管理が可能となる内部コントロール物質（I.C.）とウイルスが失活する試薬が入っている。ここまでの操作はBCL2検査室で実施し、検査員はN95マスク・ガウンなど上述の重装備で作業を行っている。I.C.は、コロナウイルスとは異なる塩基配列を持つRNA（馬動脈炎ウイルスEAVの一部の塩基配列をもつRNA）である。これを既知量添加することで、RNA抽出効率、cDNA合成効率、PCR効率が分かり、検査が問題なく実施できたかの指標となる。

## 8・4 核酸抽出

現在最も普及している核酸抽出法は、カオトロピック剤（グアニジンイソチオシアネートなど）存在下において核酸がシリカ粒子に結合する特徴を利用するブーム法である。フィルター法はシリカフィルターに核酸を結合

させ、不純物を洗い流し、核酸を溶出するものであり、洗浄、溶出工程では遠心分離や吸引法が使われている。一方ビーズ法は鉄粉入りシリカビーズを用い、磁石にビーズが結合することを利用して、洗浄・溶出を行う。

検体を採取したスワブは約3mLの保存液の中に入っている。ここから300μLを分注し、核酸抽出を行い、最終的には約50μLの核酸溶液となる。したがって、鼻咽頭を拭い10<sup>5</sup>個のウイルスを採取した場合には、10<sup>5</sup>個/3mLとなり、その約1/10容が核酸抽出に用いられる。核酸抽出効率を50%と仮定すると、最終核酸抽出溶液の1/5容10μLを反応系に添加した場合10<sup>3</sup>個のウイルスが入ることになる。すなわち、検体採取からPCR開始までの工程で1/100のウイルス量となる。仮に、検体採取時に10<sup>3</sup>個のウイルス量であった場合は、10個程度となり、図3に示すように再現性が低下し、偽陰性が生じやすくなる。検体採取はPCR検査において、極めて重要な検査工程のスタートである。

## 8・5 核酸増幅工程

コロナウイルスは1本鎖RNAウイルスであることから、PCR工程の前にRNAから相補的なDNA（cDNA）を合成する必要がある。この反応に使用する酵素はRNA依存性DNAポリメラーゼ（リバーストランスクリプターゼ、逆転写酵素）と呼ばれている。また、この酵素の由来起源はコロナウイルスと同様のRNAウイルスである。反応系の中にコロナウイルス由来RNAが存在すれば、プライマーが結合し、cDNAが合成される。同時に核酸抽出時に人為的に添加したI.C.も特異的プライマーによりcDNAが合成される。

表5にLightmix Modular SARS-CoV E-gene試薬の反応条件を示した。PCRは、陽性コントロール（Positive Control: P.C. コロナウイルスのRNAの一部）と2種の陰性コントロール（Negative Control: N.C.1, N.C.2）と共に実施する。陽性検体は、コロナウイルス遺伝子に由来する遺伝子増幅が起こり、Cp（Crossing Point）値が算出される。Cp値は2nd derivative法で計算され、蛍光色素が検出され始めた時点のサイクル数である（図3）。一方、陰性検体ではコロナウイルス遺伝子が存在

表5 新型コロナウイルスPCR検査 反応条件

温度	時間	回数	働き
55℃	5分間	1	逆転写反応
95℃	5分間	1	PCR反応
95℃	5秒間	40	
60℃	15秒間		
72℃	15秒間		
40℃	30秒間	1	反応終了冷却

しないので Cp 値が算出されない。I.C. の増幅は、核酸抽出工程を経た検体は増幅し、本工程を経ていない P.C. と N.C.2 では増幅しない。

図 5 は、Lightmix Modular SARS-CoV E-gene 試薬の検査結果である。検体 3 の Cp 値は 21 サイクルであり、検体 2 の Cp 値は 32 サイクルである。検体 1 は Cp 値が得られず、陰性である。定量検査ではないが、Cp 値より病原体量を推定できる。Cp 値 32 は、およそ数百コピー（病原体由来 RNA 分子数）と推定できる。また、二つの陽性検査の Cp 値差が 11 であることから、検体 3 は検体 2 に比べ約 1000 倍病原体が多いと推定できる。図 6 は I.C. の遺伝子増幅の結果である。I.C. の Cp 値はどの検体においてもほとんど同じであったことから検査が問題なく行われたことが分かる。

### 8・6 検査結果判定

Lightmix Modular SARS-CoV は診断薬ではないが保険収載可能な検査薬である。この試薬は 2003 年に流行した SARS-CoV の検査試薬である。塩基配列の相同性から、今回発生した新型コロナウイルスにも利用できる検査薬として認められ、保険適用になった。

検査結果は PCR による遺伝子増幅度を示す Cp 値で評価される（図 5, 6）。検査員は、P.C., N.C. の反応結果、あらかじめ設定したカットオフ値（Cp 値 38, 約 10 コピー/反応）を基に陽性（検出）、陰性（検出せず）を決める。さらに、I.C. の増幅度合い、増幅曲線の異常など再検査基準を設け最終判定を行っている。再検査になった検体は、再度核酸抽出工程からの検査となる。

一方、診断薬として承認を受けたコバス SARS-CoV-2 試薬は、既に B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）などの検査を実施している検査システム（コバス 8800 システム）の中で利用できる。これにより、多くの検体が効率よく検査できるようになった。このシステムは、核酸抽出から PCR 工程、検査判定工程までが自動化されている。当社では独自の検査判定システムを構築し、自動判定された検査結果の再確認、検査履歴確認などを行い、不整合の場合は自動再検査となるようにしている。現在、十分な精度管理の基、迅速で正確な検査を行っている。

### 8・7 検査報告

PCR 検査の最終判定結果は検査履歴として保存され、検査依頼者からの問い合わせにも対応できる仕組みになっている。新型コロナウイルス PCR 検査では、検体採取された日の翌日夕方には検査結果が得られる。電子カルテに検査結果を直接送信する方法もあるが、多くは当社営業所経由で検査結果が依頼者に送られる。したがって、検体採取日から最速 2 日で依頼者に検査結果

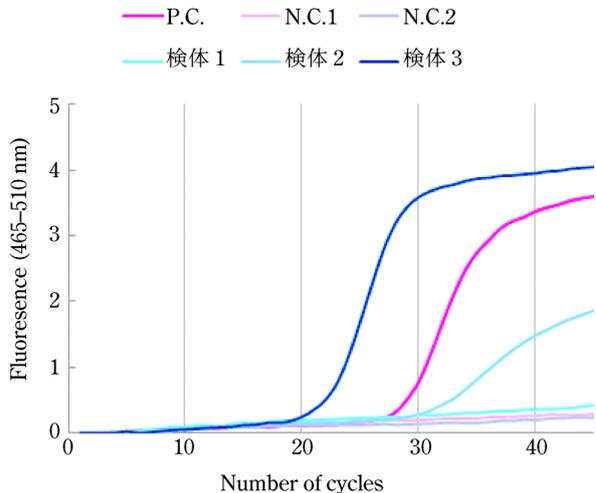


図 5 新型コロナウイルス検査結果（ターゲット遺伝子増幅）。検体 1 は陰性、検体 2 は弱陽性、検体 3 は陽性検体であり、これらの増幅曲線を示した。P.C.：PCR 増幅が成立する新型コロナウイルス RNA の一部を反応系に添加することから、必ず陽性となる。増幅が認められない場合は反応液組成に問題があると判断する。N.C.1：抽出工程からの陰性コントロール、N.C.2：反応系の陰性コントロールであり、増幅は認められない。N.C.に増幅を認める場合は、検査工程に問題があると判断する。

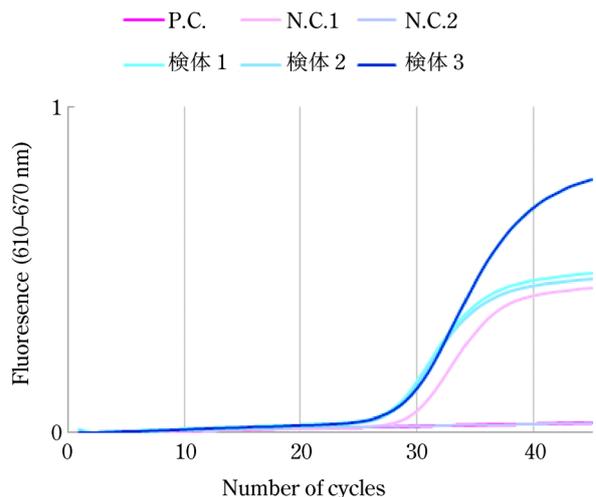


図 6 新型コロナウイルス検査結果（I.C. 遺伝子増幅）。I.C. は核酸抽出工程で人為的に添加することから、本工程を経た試料は全て増幅する。P.C. と N.C.2 は、核酸抽出工程を経ておらず、反応時のコントロールであることから、I.C. の増幅は認められない。N.C.1 は、核酸抽出工程からのコントロールであり、I.C. の増幅が認められる。I.C. の増幅曲線がほぼ同じサイクル数（横軸）で立ち上がっていることから、検査が問題なく行われたことが分かる。

が届くことになる。

## 9 最後に

2020 年 4 月 7 日、初の緊急事態宣言が発出され、約 1.5 か月後の 5 月 25 日に最後となった首都圏と北海道も解除され、全都道府県で宣言解除となった。しかしながら、新型コロナウイルスが消失した訳ではなく、感染

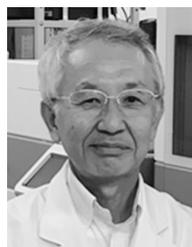
防御しながらの新しい生活が始まった。感染の第2波に備えてPCR検査数の拡充が要望され、当社でも1日1000検査以上のPCR検査体制を整えた。さらに、感染歴を検査する抗体検査も6月8日より開始した。

日本では新しい感染症が発生すると、指定感染症となり、検体採取もより高度な防止策がとられ、検体搬送も三重梱包で行われる。検査の前に搬入される検体の開梱、除染など特別な工程も増加する。また、検査資材も海外から輸入されるものが多く、パンデミックの影響を受け、平常時にはすぐに入庫する物品の供給が遅延し、経済の世界的繋がりを改めて思い知らされることとなった。

新型コロナウイルスの感染拡大は新しい生活習慣、New Normalを生み、様々な業種に影響を与える。社会全体が変化し、新しい価値観が生まれ、働き方改革も大きく前進するものと考えられる。検査業界においても、一層の自動化、ロボティクスによる改革が加速し、工程の簡素も進み、用手工程が減少するものと思われる。我々も価値ある検査を迅速に提供できる体制が必要と考えている。

## 文 献

- 1) R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, et al: Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications of virus origins and receptor binding, *Lancet*, **395**, 565 (2020).
- 2) 国立感染症研究所：SARS（重症急性呼吸器症候群）とは、available from 〈<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/414-sars-intro.html>〉 (accessed 2020-06-29).
- 3) 国立感染症研究所：中東呼吸器症候群（MARS）とは、available from 〈<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/mers.html>〉 (accessed 2020-06-29).
- 4) 新型コロナウイルス検査に関わる施設基準ならびに、検体搬送・精度管理方針【提言】2020年5月12日改訂、available from 〈[http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19\\_teigen](http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_teigen)〉.



島津光伸 (Mitsunobu SHIMADZU)

株式会社 LSI メディエンス メディカルソリューション本部ゲノムサイエンス研究室 (〒174-8555 東京都板橋区志村三丁目30番1号)。東京理科大学応用生物科学科。(博士医学) 東京大学。《現在の研究テーマ》微小残存腫瘍細胞の高感度検出。  
E-mail: Shimadu.Mitsunobu@mh.medience.co.jp

## 原 稿 募 集

ロータリー欄の原稿を募集しています

### 内 容

談話室：分析化学、分析方法・技術、本会事業（会誌、各種会合など）に関する提案、意見、質問などを自由な立場で記述したもの。

インフォメーション：支部関係行事、研究懇談会、国際会議、分析化学に関連する各種会合の報告、分析化学に関するニュースなどを簡潔にまとめたもの。

掲示板：分析化学に関連する他学協会、国公立機関の主催する講習会、シンポジウムなどの予告・お知らせを要約したもの。

### 執筆上の注意

1) 原稿量は1200～2400字（但し、掲示板は

400字）とします。2) 図・文献は、原則として使用しないでください。3) 表は、必要最小限にとどめてください。4) インフォメーションは要点のみを記述してください。5) 談話室は、自由投稿欄です。積極的発言を大いに歓迎します。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2  
五反田サンハイツ 304号  
(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会  
[bunseki@jsac.or.jp]