

緊急連載 「新型コロナウイルスと分析化学」

3大都市圏を中心に1都2府8県では、2回目の緊急事態宣言が発出され、新型コロナウイルス感染症の終息の見通しが立たない状況が続いています。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策に関して、分析化学的視点に基づき、正しく理解していただくことを目的としております。

この2号においては、新型コロナウイルスの感染者数が最も多い東京都内の検査を担っている東京都健康安全研究センターでの検査体制について紹介します。新しい感染症の検査試薬は存在しないため、昨年1月中旬に感染研マニュアルに基づいて新型コロナウイルスの検査体制を構築し、8月上旬には全自動の検査体制に移行し、感染者の早期発見に努められています。さらに、日々の検査で明らかになってきた現在の検査法の課題などについても解説します。本連載が、会員皆様の理解の一助となれば幸いです。

新型コロナウイルス検査試薬と東京都における検査対応 (2020年1~10月)

貞 升 健 志

1 はじめに

2019年12月末に中国湖北省武漢で発生した新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症(COVID-19)は、2020年1月15日に国内第1例が発生後、4月上旬に第1波、8月上旬には第2波のピークを迎え、その後12月には第3波となり感染者の報告が続いている。東京都健康安全研究センター(当センター)が国内3例目(1月25日)の検査を実施したように¹⁾、1月の下旬には、ほぼ全国の地方衛生研究所でSARS-CoV-2検査体制を整えていた。

一般に、新たな感染症(新興感染症)の検査試薬は、体外診断用医薬品(IVD)も研究用試薬(RUO)も存在しないことが多い。そのため国立感染症研究所(感染研)が作成した病原体検査マニュアル(感染研マニュアル)に基づき、地方衛生研究所と感染研が連携し検査を実施する。その後、感染症によってはIVD試薬、RUO試薬が数年以内に販売されることになるが、市販されない感染症検査試薬もある。

感染研マニュアルに準拠する核酸増幅検査の多くは比較的散発的な感染症が多く、COVID-19検査のように、毎日、多量の検体を検査し続けることはあまり想定されていない。そのため、地域差はあるかもしれないが、首都圏においては第1波時には検査実施機関のみならず、検査依頼機関やその後の処理を行う機関を含め

て、ある意味限界に近かった。あえて言えば、2009年の新型インフルエンザ(AH1N1pdm2009)発生時の状態に近いが、全数検査の継続期間は3か月間程度であったのに対し、COVID-19では既に1年間以上継続している。

現在では、感染研マニュアル以外に多くの市販SARS-CoV-2検査試薬が開発・販売され、IVD試薬やRUO試薬が混在している状況にある。厚労省は8月31日の事務連絡で、新型コロナウイルスに関する核酸増幅検査の追加については、薬事承認を取得したものを原則とし、そうでない検査試薬は薬事承認を得るように努めることとしている。

本稿では、SARS-CoV-2検査試薬や検査の実際(2020年1~10月)と今後の課題について考えてみたい。

2 東京都におけるSARS-CoV-2検査体制の構築

当センターでは本年1月中旬には感染研マニュアルに基づき、検査体制を整えた。年度末ではあったが、新型インフルエンザウイルス対策で10000件程度の検査用試薬等を備えていたため、それを検査に活用した。具体的には、バイオハザードレベル3実験室(BSL3実験室)で使用するN95マスク、ディスポーザブルガウンや手袋等の個人予防具(PPE)、咽頭スワブ等用の検体

採取容器、検体搬送用パウチ袋、核酸抽出試薬やリアルタイム PCR 用の基礎的試薬である。検査検体（鼻咽拭い、鼻咽頭拭いまたは唾液等）は感染性を有するため、PPE 着用の上、BSL3 実験室で不活化処理を行った後（図 1）、BSL2 実験室において核酸増幅検査を実施してきた。

当センターでは、国内第 3 例目の検査対応を始めに、武漢からの政府チャーター便やクルーズ船乗客の検査も厚労省からの依頼により実施した。その後も都内保健所の積極的疫学調査等の検査対応を実施し、総検査数は約 50000 件、陽性数はその 10 % にあたる約 5000 件（10 月末現在）である（図 2）。



図 1 バイオハザードレベル 3 (BSL3) 実験室における SARS-CoV-2 検査検体の前処理（不活化処理）

備蓄試薬を使用しながら、新たに試薬を買い足していたが、海外での消費やロックダウン等の輸入経路の遮断等による世界的な供給不足により、海外製の抽出試薬等を十分に入手することができなくなった。そこで、検査を継続するために、国内産の簡易抽出を用いたリアルタイム PCR による検査に 5 月上旬から切り替えた。さらに、検査数増を目的とし、8 月上旬より IVD 取得の検査試薬を用いた全自動の機器による検査へと移行した。当センターにおける検査陽性率は、第 1 波では高い傾向にあったが、第 2 波では下降してきており、10 月末の時点では 5 % 前後で推移していた。

3 SARS-CoV-2 検査とは

一般に、SARS-CoV-2 感染後の検体中の抗原・RNA 量の変化は図 3 に示す通りと考えられている（図 3）²⁾。鼻咽頭を例にすると、発症前から鼻咽頭中のウイルス量が増加する。Vero 細胞系を用いれば感染初期のウイルス量が多い時期だけウイルス分離は可能であるが、検査時間に 1~2 週間を要するため、感染診断法としては適さない。ふん便材料はウイルス遺伝子の検出報告はあるが検査試料としては不向きであり、尿や血液ではウイルスの検出率は低い。喀痰は、当初、高感度な検体として使用されていたが、検体処理に難があること、他の検体でも十分な精度を持つこと等の認識から、現在は鼻咽頭拭い液や唾液検体が主に用いられている。特に、唾液検体は採取時の侵襲性が低いことから汎用されている。鼻腔拭いについても侵襲性が低く、自己採取も

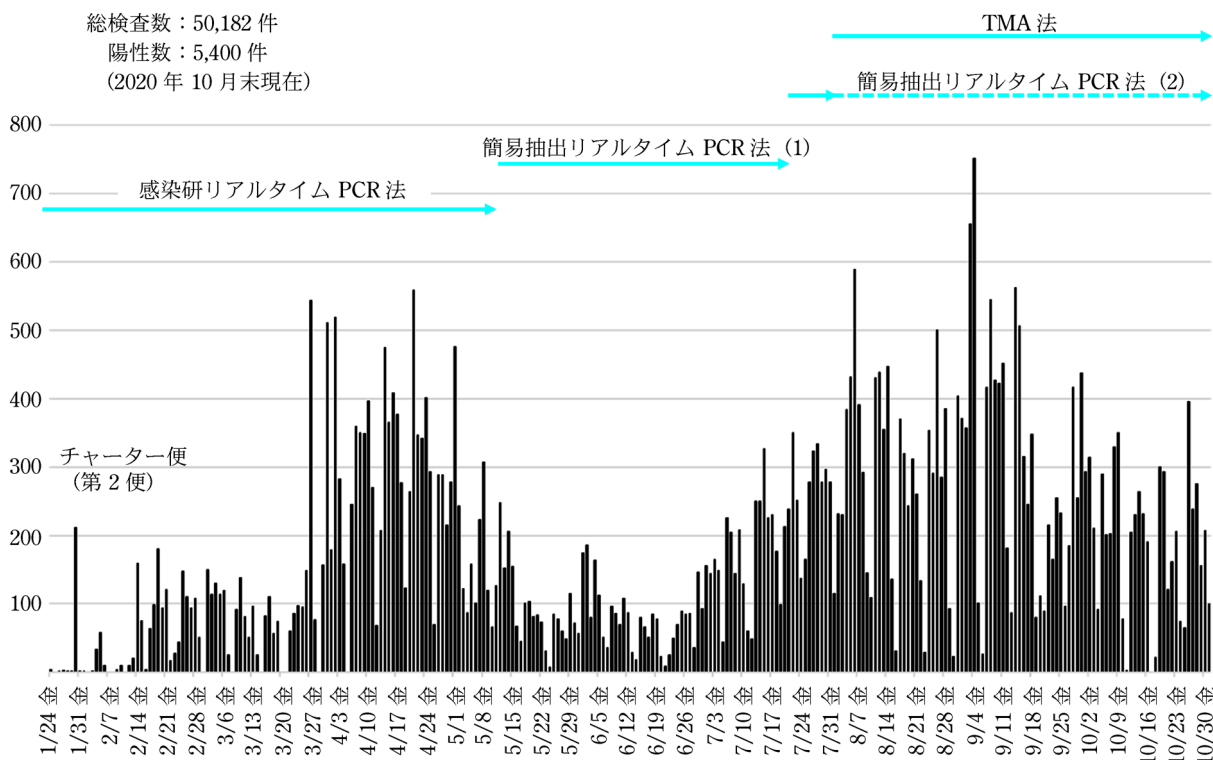
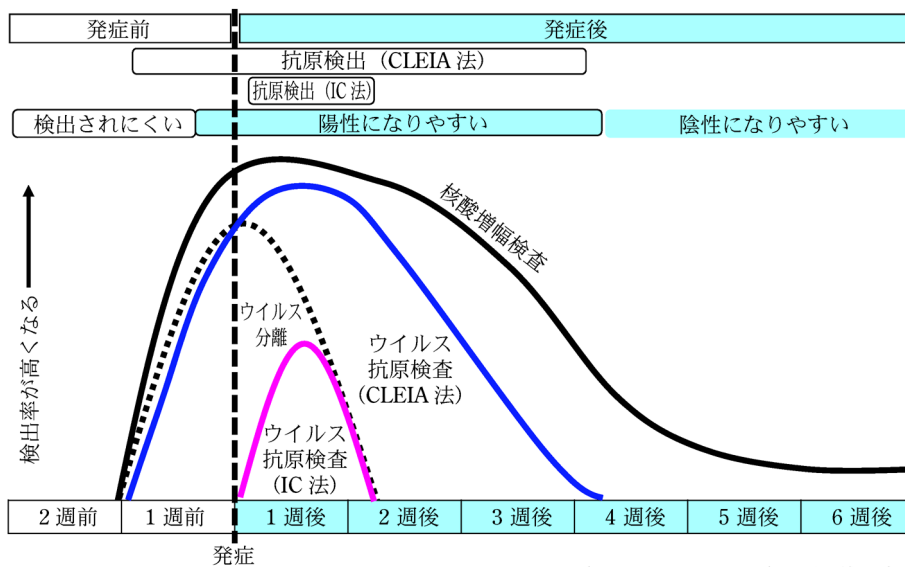


図 2 東京都健康安全研究センターにおける SARS-CoV-2 検査数（2020 年 1~10 月）



Sethuraman N. et al (JAMA, May 6, 2020) より引用改変

図3 SARS-CoV-2感染後のウイルス量の変化（鼻咽頭拭い液）

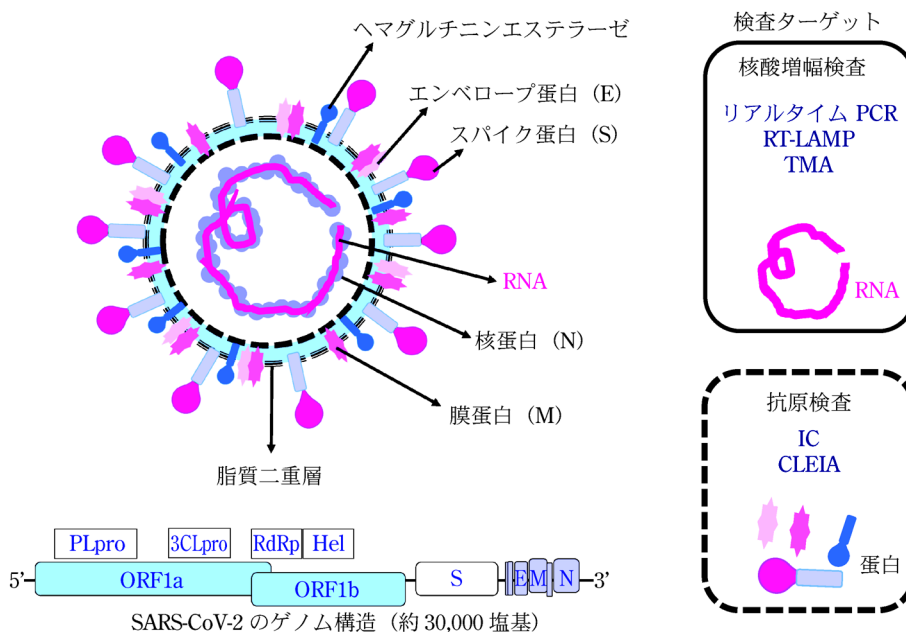


図4 SARS-CoV-2の模式図とゲノム構造

可能な検体として今後の使用が期待される。一般に、抗体検査は感染の有無を調査するのに重要なツールとなっているが、SARS-CoV-2感染については検査診断としては使用されておらず、我が国においてIVDを取得した試薬はまだない。

4 SARS-CoV-2 検査試薬

SARS-CoV-2 検査試薬には、大きく分けて2種類存在する(図4)。SARS-CoV-2 遺伝子(核酸RNA)を標的とし、核酸増幅し検出する試薬(核酸増幅検査)とSARS-CoV-2 構成タンパクを抗原抗体反応で捕捉・検出試薬(抗原検査)である。一般に、抗原検査は迅速性に

に優れているが、核酸増幅検査と比べて感度・特異度がやや劣る(図3)。なお、抗原検査法には据え置き型である定量法(CLEIA法)と現場で検査が可能な定性法(IC法)があり、それらの用途は病原体検査指針³⁾で定義されている(表1)。IC法は有症状者でのみ使用可能であり、核酸増幅検査とCLEIA法は無症状者でも使用可能である。唾液はIC法では使用不可であり、鼻腔拭いは無症候者の検査に推奨されていない。

冒頭に記したように、新規のSARS-CoV-2行政検査については、薬事承認を取得したものを原則とする方針となった。現在、薬事承認を得ている試薬は、核酸増幅検査試薬は17試薬(表2)、抗原検査試薬には5試薬

表1 各種 SARS-CoV-2 検査の特徴

検査対象者	核酸増幅検査 (PCR, LAMP 法等)			抗原検査 (定量) (CLEIA 法)			抗原検査 (定性) (IC 法)		
	鼻咽頭	鼻腔	唾液	鼻咽頭	鼻腔	唾液	鼻咽頭	鼻腔	唾液
有症状者 (発症から 9 日目以内)	○	○	○	○	○	○	○	○	×
有症状者 (発症から 10 日目以降)	○	○	—	○	○	—	△	△	×
無症状者	○	—	○	○	—	○	—	—	×

○：使用可能；×：使用不可；△：使用可能だが、陰性の場合には鼻咽頭等の核酸増幅検査を行う必要あり；—：推奨されない

あり(表3)(2020年11月2日現在)、今後さらに増加する可能性が高い。核酸増幅試薬では温度の上げ下げと特異蛍光プローブを反応させるリアルタイム PCR の原理に基づく核酸 (DNA) 増幅試薬が 13 種と最も多く、温度を上げ下げしない、等温の DNA 増幅試薬が 2 種、そして核酸 (RNA) 増幅試薬が 2 種である。

指針では検査法と症状の有無で適用範囲を定めているが、SARS-CoV-2 感染者の多くが不顕性感染であり、感染初期にウイルス量が多いことから、適切な検体と採取時期はまだ不明確と言える。検査の選択の幅が広いことは良いことであるが、試薬には結果の解釈を含めて特徴(癖を含めて)がある。さらに SARS-CoV-2 の特徴が判明し、開発が進めばいずれ数社の試薬に収束していく可能性もある。

表2 COVID-19 の体外診断用医薬品 (核酸増幅法)

No.	品 目 名	製造販売業者名	検査法	承認日
1	2019-nCoV 検出蛍光リアルタイム RT-PCR キット	シスメックス株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年3月27日
2	Loopamp 新型コロナウイルス 2019 (SARS-CoV-2) 検出試薬キット	栄研化学株式会社	核酸増幅法 (LAMP 法)	令和2年3月31日
3	コバス SARS-CoV-2	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年4月7日
4	TaqPath 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) リアルタイム PCR 検出キット	ライフテクノロジー ジャパン株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年4月20日
5	Xpert Xpress SARS-CoV-2「セフィエド」	ベックマン・コールター株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年5月8日
6	MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット	株式会社医学微生物学研究所	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年5月21日
7	FilmArray 呼吸器パネル 2.1	バイオメリュー・ジャパン株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年6月2日
8	ジーンキューブ SARS-CoV-2	東洋紡株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年7月2日
9	2019 新型コロナウイルス RNA 検出試薬 TRCReady SARS-CoV-2	東ソー株式会社	核酸増幅法 (TRC 法)	令和2年7月31日
10	SmartAmp 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出試薬キット	株式会社ダナフォーム	核酸増幅法 (SmartAmp 法)	令和2年8月17日
11	SARS コロナウイルス核酸キットアプティマ SARS-CoV-2	ホロジック株式会社	核酸増幅法 (TMA 法)	令和2年8月18日
12	Ampdirect 2019-nCoV 検出キット	株式会社島津製作所	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年9月8日
13	アイデンシーパック SARS-CoV-2	株式会社アークレイファクトリー	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年9月8日
14	ID NOW 新型コロナウイルス 2019	アボットダイアグノスティックスメディカル株式会社	等温核酸増幅法	令和2年10月20日
15	ジーンキューブ HQ SARS-CoV-2	東洋紡株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年10月23日
16	SGNP nCoV/Flu PCR 検出キット	株式会社スティックスバイオテック	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年10月23日
17	Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット	タカラバイオ株式会社	核酸増幅法 (RT-PCR 法)	令和2年10月27日

厚労省ホームページ (https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html) より引用 (2020年11月2日現在)

表3 COVID-19の体外診断用医薬品（抗原検査法）

No.	品目名	製造販売業者名	検査法	承認日
1	エスプライン SARS-CoV-2	富士レリオ株式会社	抗原検査法 (簡易キット)	令和2年5月13日
2	ルミパルス SARS-CoV-2 Ag	富士レリオ株式会社	抗原検査法 (定量)	令和2年6月19日
3	クイックナビ-COVID19 Ag	デンカ株式会社	抗原検査法 (簡易キット)	令和2年8月11日
4	イムノエース SARS-CoV-2 キャピリア SARS-CoV-2	株式会社タウンズ	抗原検査法 (簡易キット)	令和2年8月12日
5	ルミパルスプレスト SARS-CoV-2	富士レリオ株式会社	抗原検査法 (定量)	令和2年10月16日

厚労省ホームページ (https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html) より引用 (2020年11月2日現在)

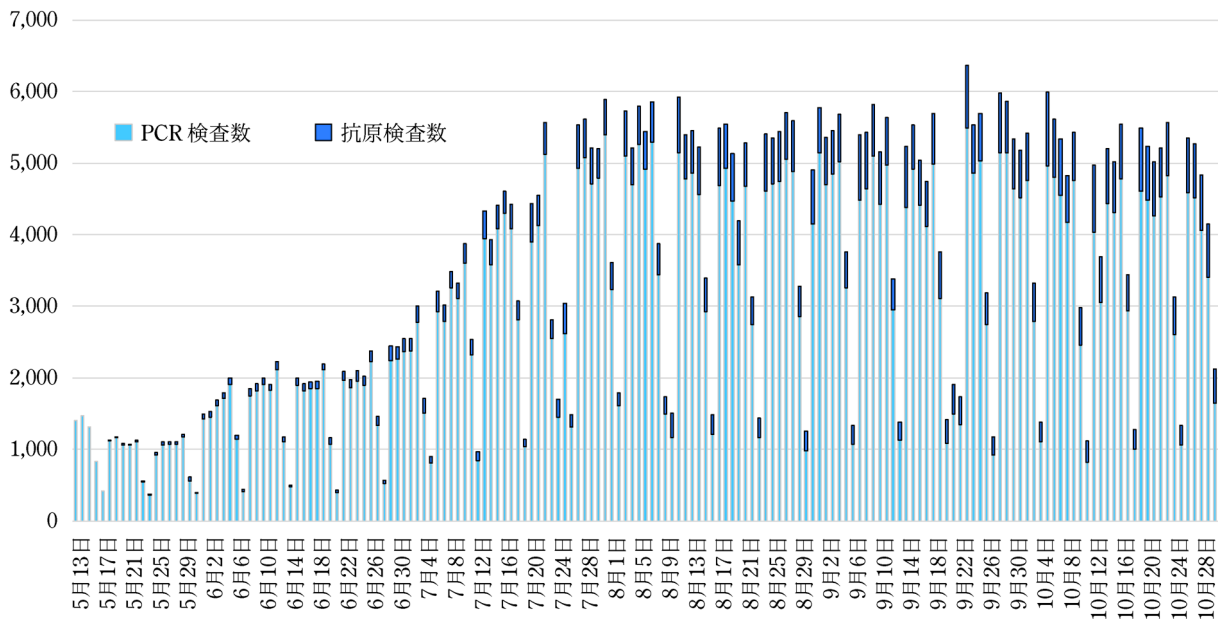


図5 東京都全体のSARS-CoV-2検査数（2020年1～10月）

5 今後の課題

現在、日本におけるSARS-CoV-2感染者数・死亡者数は、アメリカや西欧の諸外国よりは低く抑えられている。日本人特有の距離感、清潔感やマスク着用率、クラスター対策や医療技術水準が反映されているものと思われる。一般に、ウイルスの病原性は流行とともに低下するものと言われているが、SARS-CoV-2の弱毒化は確認されておらず、さらに感染力の強い変異株(N501Y)も諸外国で報告されている。クラスターを拡大させないためには、個人個人が自覚を持って行動すること、クラスター発生時には即座に検査を実施し、最小限に抑えることが必要となる。また、SARS-CoV-2検査での課題を挙げると、検査規模の拡充、試薬の精度と精度管理等が挙げられる。

1) 検査規模の拡充

10月末現在、東京都の検査総数は平日で平均6000件

程度である(図5)。当センター以外には、民間の登録衛生検査所(SARS-CoV-2検査を行うための臨時開設を含む)や医療機関で検査が実施されている。検査はクラスター対策の根幹を成すものであり、検査を受けるべき人が受けられない状況があってはならない。また、自費検査機関(自由診療)のSARS-CoV-2検査はこのような検査総数の対象外である。今後海外へ行く際には、陰性証明も必要となってくるであろう。そのため、自費検査機関も含め、検査規模の拡充は必要であり、さらにはどこに行けば検査が可能なのか等の情報の集約・管理も将来的に必要なものと考えられる。

SARS-CoV-2検査陽性者が発生した場合には、担当保健所が陽性者の状態の把握し、入院等の措置さらには濃厚接触者の調査等を行う。業務の量の増大に備え、保健所から都道府県庁・厚生労働省への報告等ではこれを機に健康危機に係る行政のさらなるデジタル化の推進が期待される。

2) 検査試薬の精度

表2, 3に示すように多くの検査試薬があり、これらからも多くの試薬の認可が進むものと思われる。これらは添付書を見る限り一応の精度保証がなされている。しかしながら、実際には細かい点での問題に遭遇することがある。例えば、鼻咽頭拭い液の容器で、採取した綿棒を入れるだけで、ウイルスの感染性が失われる容器が使用され始めている。そのような容器の中には、グアニジン等が入っており、簡易抽出試薬では増幅酵素が不活化されてしまうため、核酸増幅そのものの反応ができない。また、認可されていない組合せで検査が実施される可能性も考えなければならない。このような想定外での検査は、偽陰性や偽陽性の原因となり得る。IVD試薬の使用を基本とし、さらには試薬の使い勝手や特徴について、ユーザーが把握したデータを共有していくことも重要となる。

また、SARS-CoV-2の検出感度をどの程度まで担保すべきかにも課題がある。すぐには難しいかもしれないが、人に感染させない程度のウイルス量は陰性と判定する必要性が出てくるかもしれない。SARS-CoV-2は急性感染症であり、慢性的な病状の経過を示すHIVやHBV感染症のようなウイルス疾患とは別である。ウイルス分離がリアルタイムPCRの30サイクル前後が臨界点であることや、マスクの感染実験で 10^5 PFUではウイルス分離がなされなかった点を考えると、国内の感染状況に応じて、また、特殊な場合を除き、感染性を示すウイルス量の指標や設定が必要と考える。

さらに、偽陽性の問題もある。核酸増幅検査は高感度な検査であるため、核酸抽出や試薬の分注操作の過程で、核酸増幅産物が試薬等に、またウイルス量の高い検体からそうでない検体にコンタミネーションを起こし、間違った結果を呈することがある。2020年の4月頃にまさしくこのような誤判定が全国各地の検査機関で発生していた。防止策としては、物理的に試薬調製室、核酸抽出室や核酸増幅室を分けること、教育訓練の徹底や自動化が重要となる。抗原検出試薬ではコンタミネーションの可能性はほぼないが、抗原-抗体反応に基づくため、ある程度の偽陽性の発生は物理的に免れることはできない。

SARS-CoV-2は約30000塩基のRNAウイルスであり(図4)、エキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼを有するため、修復システムを持っている。そのため、大きな遺伝子変異は起きないが、巧妙に変異を起こす⁴⁾。変異速度は現在のところ約24塩基変異/ゲノム/年とされ、当センターでの分離ウイルスの解析でも、いろいろな遺伝子領域で変異が認められている。核酸増幅検査の増幅領域は、新型コロナウイルスのORF1ab, S, EやN領域であり、これらの領域でも変異が認められる。現在、遺伝子変異による検査試薬の感度低下は報告

されていないが、遺伝子変異が検査感度の低下を招く他のウイルス感染症の事例も知られており、今後も注視していく必要がある。

3) 精度管理 (外部)

SARS-CoV-2検査試薬がこのように出回っている中では、前述のように、試薬の管理以外に、検査精度の正当性を評価する試みも必要である。一般に、検査にかかる精度保証のために、施設内での精度管理(内部精度管理)の他に、外部精度管理がある。内部精度管理は、個々の検査室であらかじめ計画を立て、検査のコントロールや検査工程が適切であること、検査に携わる職員の技量を定期的に担保する。また、外部精度管理では、客観的に検査の精度の評価が可能である。SARS-CoV-2検査についても、全国レベルでの実施がなされており、検査実施施設は自施設の精度保証のためにも、外部精度管理調査への参加を考えるべき時期にある。

6 最後 に

改めて考えてみると、今回のSARS-CoV-2/COVID-19は新型インフルエンザやヒト免疫不全ウイルス感染症とも全く異なる、かつてない異次元の感染症である。ワクチンや特効薬の出現までは、あらゆる能力を使い、この感染症のさらなる蔓延を抑えつつ、日常生活を元に戻していく必要がある。現状での蔓延防止に使える最も現実的かつ有効なツールは検査のみである。我々は一致団結し、唯一の武器の高い検査精度を保ちつつ、迅速・効率的な運用を継続して実施しなければならない。

文 献

- 1) 千葉隆司, 貞升健志, 長島真美, 熊谷遼太, 河上麻美代, 浅倉弘幸, 内田悠太, 加来英美子, 糟谷 文, 北村有里恵他: 健康安全研究センターにおける新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の検査対応(2020年1月~5月), 東京健安研七年报, (印刷中)(2020).
- 2) Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A: *JAMA*, **323**, 2249 (2020). doi: 10.1001/jama.2020.8259. (2020)
- 3) COVID-19病原体検査の指針(第1版), available from (<https://www.mhlw.go.jp/content/000678571.pdf>) (accessed 2020-11-02)
- 4) 浅倉弘幸, 長島真美, 熊谷遼太, 吉田 勲, 長谷川乃映瑠, 長谷川道弥, 藤原卓士, 林 真輝, 永野美由紀, 山崎貴子, 他: 東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析(2020年2月~5月), 東京健安研七年报, (印刷中)(2020).



貞升健志 (Kenji SADAMASU)
東京都健康安全研究センター (〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1)。博士(獣医学)。
E-mail: Kenji_Sadamasu@member.metro.tokyo.jp