
東京都微生物検査情報

MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT、 TOKYO

第41巻 第3号
2020年 3月号
月 報

 東京都健康安全研究センター

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>

ISSN 1883-2636

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検査法

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は 29,800 塩基からなる RNA ウイルスであり、コロナウイルス科 オルソコロナウイルス亜科 ベータコロナウイルス属に属する。同じくベータコロナウイルス属に属するウイルスには、鼻風邪の原因となるコロナウイルスの他、重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルスや、中東呼吸器症候群 (MERS) ウイルスが含まれている。遺伝子学的に SARS コロナウイルス (SARS-CoV) に近縁なウイルスであるが、コウモリやセンザンコウ由来のコロナウイルスに近い起源であることが示唆されている。

主な感染経路・症状は、感染者の飛沫中の SARS-CoV-2 が鼻、口、目等を通して体内に入り込み 1～14 日の潜伏期間の後、発熱、咳、味覚・嗅覚異常や軽度から重症の呼吸器疾患を起こす。なお、他者に感染させる可能性のある期間は発症前 1～2 日からと言われている。

一般にウイルス検査法には、ウイルス分離法、抗原検査法、抗体検査法や遺伝子検査法がある。SARS-CoV-2 を分離するには生きた細胞を用いるが (SARS-CoV-2 は VeroE6 細胞等で培養が可能¹⁾) (図 1)、少なくとも 1～2 週間を要し必ずしも全ての感染者から分離されるわけではない。また、抗原検査法 (イムノクロマト法等) は医療機関で実施されているインフルエンザ検査のように、鼻腔拭い液中のウイルス抗原そのものを簡易に検出する方法である。迅速性の面で優れている反面、遺伝子検査の感度よりも著しく劣るため、現場での使用法について検討していく必要がある。抗体検査法は感染した証拠として SARS-CoV-2 に対する抗体 (IgG や IgM) を検出する方法である。感染率の調査等の疫学解析に欠かせない方法であるが、現在の感染を必ずしも示すものではない。そのため、現状では保険適用を受けた遺伝子検査法が新型コロナウイルス検査法として広く利用されている。

新型コロナウイルスの遺伝子検査として利用されている検査法の多くは、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の原理に基づいている (図 2)。PCR 法とは遺伝子を合成する耐熱性ポリメラーゼ (逆転写酵素の能力を持つ DNA 合成酵素)、遺

伝子断片 (プライマー) や温度の上げ下げを利用して、試験管内で特定の遺伝子を増やす方法である。遺伝子 (DNA) は塩基 (A、T、C、G) の繋がりできており、その繋がり互いに相補的な二本鎖の構造を成している。まず、温度が 90℃以上になると二本鎖構造が壊れ、DNA がそれぞれ一本鎖になる。温度を 60℃前後に下げると、再び二本鎖に戻る性質があるが、あらかじめ増幅したい領域 (60～数百塩基) を挟み込むように設計されたプライマー (約 20 塩基) を 2 種類 (A、B) を入れておくことで、それぞれのプライマー A、B と合致する相補的な塩基配列と付着し二本鎖を構成する。温度を上昇させていくと、高温で活性化耐熱性ポリメラーゼの作用により、プライマー A、B を起点として DNA が合成されていく。1 回の温度の上げ下げにより、当初の遺伝子が 2 倍に増えるが、この過程を 40～45 回繰り返すことで、プライマーに挟まれた領域の遺伝子のみが理論上 $2^{40} \sim 2^{45}$ 倍 (1～35 兆倍) に増幅されることとなる。

PCR 法の原理を用いた RT-リアルタイム PCR 法 (図 3) は、新型コロナウイルスの一般的な検査方法である。先に述べたように、SARS-CoV-2 は RNA ウイルスであるため、まず逆転写酵素 (RT) 作用により RNA を DNA に変換する必要がある。次に、増幅される遺伝子が SARS-CoV-2 であることを確認するために、プライマーとともに、蛍光を発する特異的な遺伝子断片 (プローブ) を使用し (プライマー A、B を挟む位置に存在)、増幅しながら目的の遺伝子の増幅を確認していく。ターゲット遺伝子 (SARS-CoV-2 RNA) が存在すれば蛍光が発せられ、その蛍光を専用機器で捕捉する。SARS-CoV-2 RNA が数多く存在すれば、温度の上げ下げ回数が少ない時点から蛍光が捕捉され検査陽性となり、SARS-CoV-2 RNA が存在しなければ、増幅がなされず蛍光は発しないため、陰性の検査結果が示される。

実際の検査では、感染を疑う患者から採取された鼻咽頭拭い液、咽頭拭い液または喀痰が検査用の検体として用いられている。また、SARS-CoV-2 RNA は患者の糞便や唾液からの検出の報告があるが、血液や尿からの検出頻度は低いことが知

られている。

まず、鼻咽頭拭い液等から SARS-CoV-2 RNA を含むであろう核酸 RNA 分画を抽出後、主な方法として、国立感染症研究所（感染研）の病原体検出マニュアル²⁾に準じたプライマーとプローブを用いた方法で検査を実施する³⁾。感染研の RT-リアルタイム PCR は SARS-CoV-2 の nucleocapsid (N) 遺伝子をターゲットとした N セットと N2 セットの 2 種類で検査を実施する。一方あるいは両方のセットで、45 回の温度の上げ下げ回数内に蛍光を捕捉（増幅曲線の立ち上がりが見られた）した場合に陽性とみなす。その他、RT-リアルタイム PCR 以外にも LAMP 法等の各種メーカー等が開発した遺伝子検査法（全自動検査機器や抽出工程の不要な検査試薬等）が厚労省により認証され、国内での販売がなされている⁴⁾。

SARS-CoV-2 の遺伝子検査における注意点は大きく 2 点ある。1 点目は、PCR 法（RT-リアルタイム PCR 法）を含め、遺伝子検査法は全て遺伝子を増やす方法であるため、増幅済の遺伝子産物（DNA）が試薬や他の検体に入り込むことや、ウイルス量の多い検体が検体の処理中に陰性の検体に少しでも入り込むことで（コンタミネーション：汚染）、偽の陽性判定が出ることがある。そのため、検査においては、試薬調製、遺伝子抽出や遺伝子増幅する場所を物理的に隔離するなどし、増幅産物や陽性検体からのコンタミネーション対策を万全にしなければならない。

2 点目に、SARS-CoV-2 は接触感染や飛沫感染によりヒトに感染するウイルスであるため、臨床検体の扱いは、的確な個人防護具（PPE）をした上で、バイオハザードレベル 2 以上（BSL2+）の安全キャビネット内で行わなければならない。医療機関内での SARS-CoV-2 感染も多く発生しており、検体を扱う過程での検査職員へのウイルス暴露には十分に注意を払わなければならない。

最後に、SARS-CoV-2 検査数を大幅に増やすことは新型コロナウイルス対策における喫緊の課題である。民間検査機関等の利用は最も現実的な選択であり、既に運用も開始されている。一般に臨床材料の検査を行うにあたっては、都道府県での登録衛生検査所としての登録が必要であるが、新型コロナウイルス検査についての登録要件は大幅

に緩和されており、感染症指定医療機関のみならず、感染対策ができている診療所や小規模な医療機関での検査も可能となっている。

一方で、新型コロナウイルス検査には根本的な課題が潜んでいることを忘れてはならない。毎日多くの検査を継続して実施するには、汎用されている遺伝子検査用の検体処理試薬、検査試薬、検査器材（検体採取に関わる消耗品）や PPE の十分な確保が必要な点である。残念ながら多くの製品は海外社製であり、また海外では日本以上に感染者が多い地域も多いことから、我が国への輸入がままならない事態も危惧される。第二に、遺伝子検査には前述したように多くの注意点が存在する。そのため、多検体を安全に失敗なく検査を実施できるシステム（自動化）やそれらを制御する人材の確保・育成が重要となる。新型コロナウイルス感染症は指定感染症であり、検査結果が入院等の隔離措置に直接つながることから、迅速に検査を実施することのみならず、正確な結果報告が重要であり、検査陽性者への対応までの一連の連携がスムーズに行われることが前提であるの言うまでもない。

SARS-CoV-2 が発見されてから早 4 か月程度が過ぎたが、全面解決までの道のりはまだ半ばである。しかしながら、検査対応を含めて今までの健康危機管理に比べて物凄いスピードで変化している。緊急事態宣言が解除となっても、SARS-CoV-2 は地上から全て消えてなくなる訳ではない。そのため、個人レベルでの予防を引き続き行い、手洗い、マスクの着用や 3 密（密閉空間、密集場所、密接場面）は避ける努力を継続する必要がある。手洗い以外にも、SARS-CoV-2 はエンベロープを有するウイルスであり、熱に弱く、手指の消毒には消毒用エタノール、手指以外の用途には次亜塩素酸ナトリウムが有効である。

歴史上極めて稀な本事例を教訓として学びつつ、今後発生するかもしれない再流行（第二波）に向けたさらなる戦いへの万全な準備も継続して開始しなければならない。

<参考文献>

- 1) Nagashima M, et al. Jpn J Infect Dis. 2020 Apr 30. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.137.

- 2) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1, 国立感染症研究所, 結核菌 VNTR ハンドブック, 地研協議会 保健情報疫学学会 マニュアル作成ワーキンググループ編
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/laboratory-test/reference/9559-2020-04-14-10-09-54.html>
- 3) 当センターにおける新型コロナウイルスの検査体制について, 東京都健康安全研究センター,

- http://www.tokyo-eiken.go.jp/lb_virus/kensa-ncov/eiken.go.jp/lb_virus/kensa-ncov/W
- 3) 臨床検体を用いた評価結果が取得された 2019-nCoV 遺伝子検査方法について, 国立感染症研究所,
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV-17-20200318.pdf>

(微生物部 貞升健志)

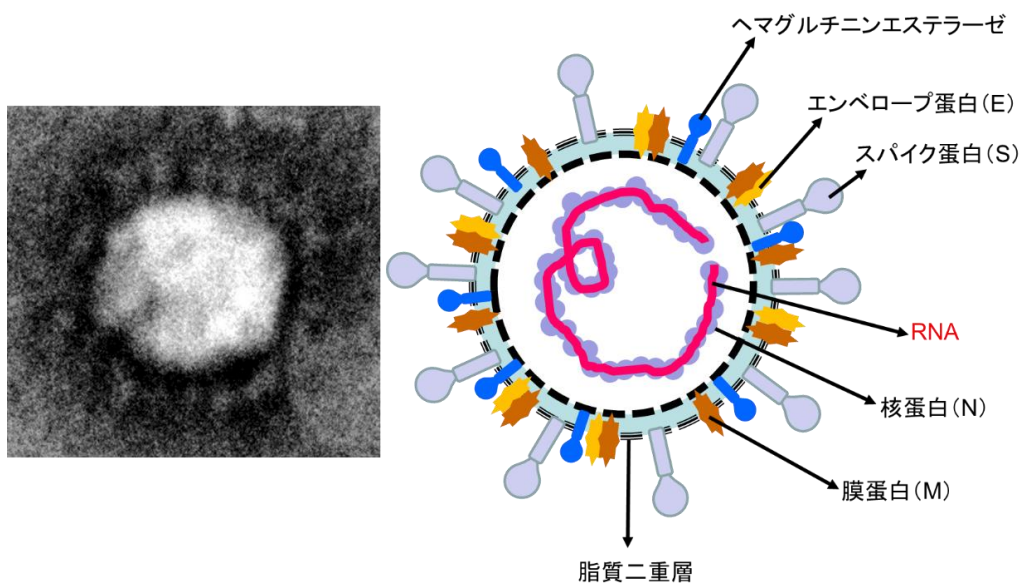
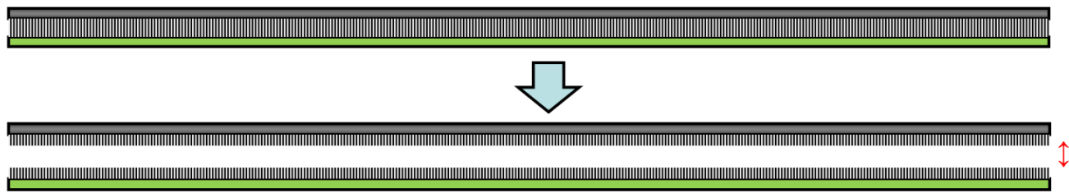


図1 Ver0E6 細胞で分離した SARS-CoV-2 の電子顕微鏡画像と模式図

ウイルス粒子を取り囲むようにしてコロナウイルスに特徴的な王冠様突起をなすスパイク蛋白が見える(写真)。PCR 法ではウイルス内の RNA がターゲットとなる(検査のために他のタンパクを除き、RNA のみを抽出する必要がある)(右図)。

(1) 高温でDNAを一本鎖にする(90°C以上)



(2) 温度を下げ、プライマー(A、B)が結合する(約60°C)。



(3) 温度を上げ、耐熱性ポリメラーゼがプライマーを起点にDNAを合成し、二本鎖DNAを作る。

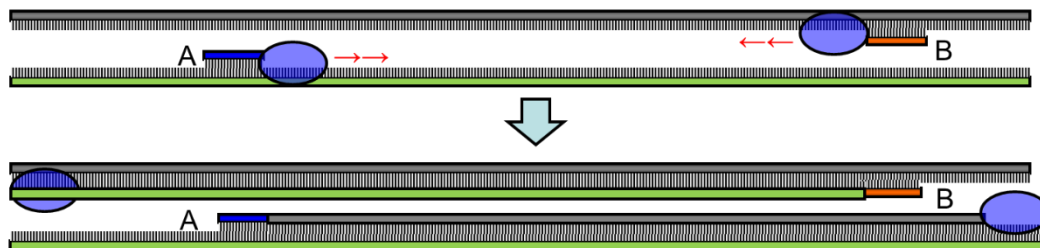
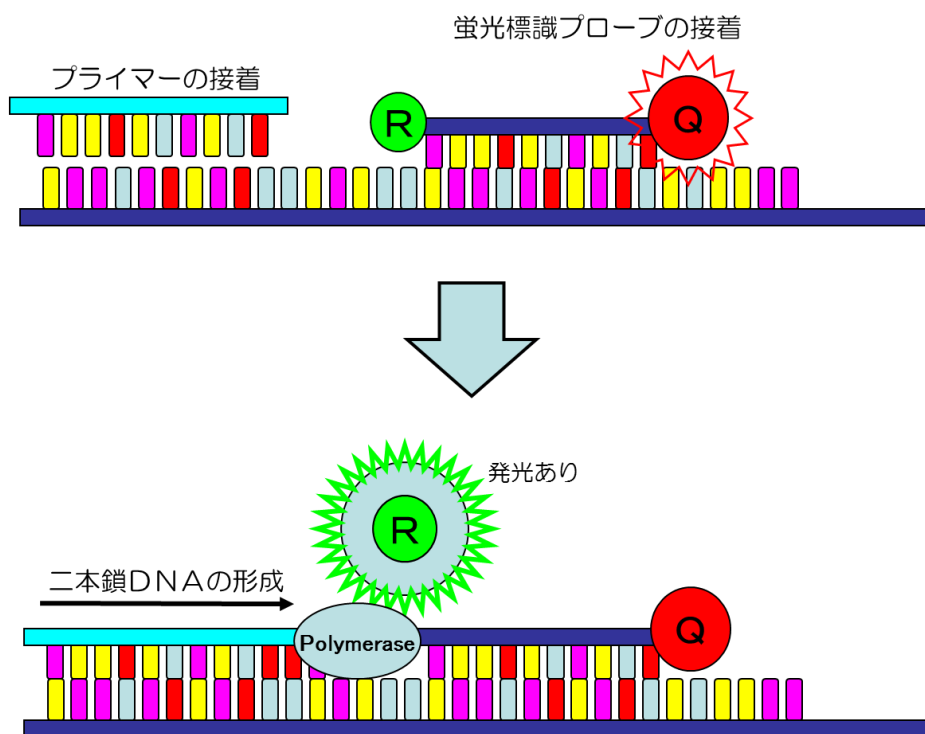


図2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の原理



耐熱性ポリメラーゼによる二本鎖DNAの形成とリポーター蛍光色素(R)の解離による発光シグナルを機器で補足する。

図3 リアルタイムPCR法の原理

表1 病原体搬入・検出状況(4種等)※

2020年3月分

機関名		コレラ菌	赤痢菌	チフス菌	パラチフスA菌	腸管出血性大腸菌	結核菌
区	千代田区						1
	中央区						
	港区					2	2
	新宿区						2
	文京区						
	台東区						
	墨田区						
	江東区						1
	品川区						
	目黒区						
	大田区						4
	世田谷区						1
	渋谷区					2	
	中野区						
	杉並区					2	
	豊島区						
	北区					2	
	荒川区						
	板橋区						2
	練馬区						3
足立区					1		
葛飾区							
江戸川区							
市	町田市					1	
	八王子市						
小計						10	16
都	西多摩						1
	多摩立川		1				
	南多摩						
	多摩府中						1
	多摩小平						
	島しょ						
小計			1				2
合計			1			10	18
健康安全研究センター 検出分							

※2016年4月より、各保健所から搬入された検体を集計することとした。

表2 検体搬入状況(全数把握対象疾患-五類)*

2020年3月分

	検体数	2020年累計
侵襲性インフルエンザ菌感染症(菌)	4	16
侵襲性髄膜炎菌感染症(菌)		1
侵襲性肺炎球菌感染症(菌)	13	32
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症(菌)	5	11
播種性クリプトコックス症(菌)	1	1
合計	23	61

※2016年4月(第37巻・第4号)から追加

表3 病原微生物検出状況(食中毒関連)

2020年3月分

	菌種名	検体数	2020年累計
細菌	大腸菌		
	毒素原性		
	組織侵入性		
	腸管出血性		
	その他・不明		
	サルモネラ		
	O4	2	5
	O7	1	1
	O8		
	O9		
	その他		
	腸炎ビブリオ		
	プレジオモナス・シゲロイデス		
	カンピロバクター	6	19
黄色ブドウ球菌			
A型ウエルシュ菌	6	21	
エシェリキア・アルベルティイ			
プロビデンシア・アルカリファシエンス			
ウイルス	ノロウイルス(G I)	20	38
	ノロウイルス(G II)	66	319
	ノロウイルス(G I, G II)	0	4
	ロタウイルス		
	サポウイルス		
寄生虫	アニサキス	2	14
	クドア		
合計		103	421

表4 HIV 検査数及び陽性数

2020年3月分

	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都南新宿検査・相談室	711	8	239	0	0	0	950	8
保健所等	136	3	76	0	0	0	212	3
合計	847	11	315	0	0	0	1,162	11
2020年累計	2,580	31	1,011	0	1	0	3,592	31

表5 性感染症検査数及び陽性数

2020年3月分

	梅毒検査		クラミジア遺伝子検査		淋菌遺伝子検査	
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
東京都南新宿検査・相談室	997	74	0	0	0	0
保健所等	175	3	148	8	78	0
合計	1,172	77	148	8	78	0
2020年累計	3,436	211	557	38	314	1

表6 定点把握疾患別病原体分離状況（ウイルス）

過去3ヶ月

定点種別	対象疾患名	検出病原体	1月	2月	3月	合計
小児科	咽頭結膜熱	アデノウイルス	3	1		4
	手足口病	エンテロウイルス	3			3
	RSウイルス感染症	RSウイルス			1	1
	不明発疹症	RSウイルス	1			1
インフルエンザ	インフルエンザ及びインフルエンザ様疾患 (ILI)	インフルエンザウイルスAH1pdm09	89	31		120
		インフルエンザウイルスAH3	1	2		3
		インフルエンザウイルスB型Victoria系統	16	27	19	62
		インフルエンザウイルスB型Yamagata系統				
基幹	無菌性髄膜炎	エンテロウイルス	1			1
基幹	インフルエンザ入院	インフルエンザウイルスAH1pdm09	6	1		7

◆ 東京都微生物検査情報 ◆

2020年 5月 22日

編集・発行

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

TEL : 03-3363-3231

FAX : 03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>