

特 集

—新型コロナウイルス感染症 2019—

新型コロナウイルス感染症の診断

¹⁾ 獨協医科大学 感染制御・臨床検査医学

²⁾ 同病院 臨床検査センター

³⁾ 同病院 感染制御センター

伊藤 裕佳^{1,2)}, 湯石 晃一²⁾, 秋山 友里²⁾, 上杉 洸太²⁾, 赤羽 珠実²⁾,
大島 春美²⁾, 池田 眞由美²⁾, 新保 敬²⁾, 田中 光昭²⁾, 樽川 友美^{2,3)},
鈴木 弘倫^{2,3)}, 堀内 裕次²⁾, 福島 篤仁^{1,3)}, 小飼 貴彦^{1,2)}, 菱沼 昭^{1,2)}

要 旨

当院臨床検査センターは、品質マネジメントに関する国際規格 ISO 15189 認定施設であり、2020年2月の当院における COVID-19 患者第1例目以降、PCR 検査を主軸とし、検査の質の保証を維持しながら検査体制を拡充してきた。本稿では、当院におけるウイルス同定検査およびゲノム解析の経験を踏まえ、COVID-19 の診断に必要な情報について概説する。

Key Words : 新型コロナウイルス感染症, 診断, 検査, 感度特異度

1. はじめに

世界保健機関 (WHO) による 2020 年 3 月の重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : SARS-CoV-2) のパンデミック宣言以降、新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019 : COVID-19) は世界を席巻している。SARS-CoV-2 は年間 25 塩基程度のペースで変異を重ねており、WHO や各国の保健行政機関は、公衆衛生上の観点から感染性・伝播性の増加が懸念される変異株 (Variants of Concern : VOCs) と注目すべき変異株 (Variants of Interest : VOIs) を公表している^{1,2)}。本邦でもこれらの変異株による波状の感染拡大が認められており、2021 年 5 月の“第 4 波”では VOCs である α 株が 9 割以上を占めた一方、本稿執筆時点 (2021 年 8 月) では“第 5 波”の渦中にあり、同じく VOCs の δ 株の検出が相次いでいる状況である³⁾。

COVID-19 の診断で留意すべき点は、周知のことながら、症状の出していないウイルスキャリアについても、今後の発症や伝播の可能性に鑑みて、確定診断する必要があることである。これにより、症状、患者背景、身体所見から病原体や感染巣を推定し、検査で確認のうえ最終的な診断を下すという、従来の感染症診療の流れとは

相容れない方法論が一般化された。すなわち、発熱や濃厚接触など、陽性適中率を高めるフィルターをかけた上でスクリーニング的に診断確定検査をとにかく行う、ということが現在広く行われている。“陽性適中率”を上げるという点で、診断確定検査そのものの性能や特性に加え、症状や経過について熟知することは、すべての臨床医にとって重要なことと考えられる。

2. 診断までの一般的な流れ

(1) 臨床症状

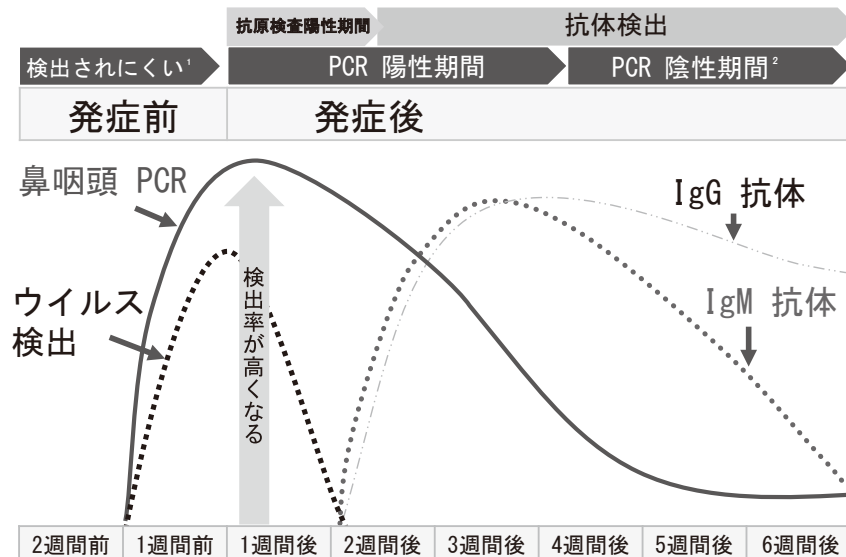
COVID-19 では、無症状で経過するケースが約 3 割と推定されているが、有症状者の約 70% では、発熱 (43%)、咳 (50%)、息切れ (29%) のいずれかがみられる⁴⁾。また、インフルエンザに似た症状が多く、筋肉痛 (36%)、頭痛 (34%)、咽頭痛 (20%)、倦怠感、下痢 (19%) や嘔吐 (12%) の頻度が高いが、鼻汁 (6%) や鼻閉の頻度は少ないことが特徴的である⁴⁾。

なお、厚生労働省による新型コロナウイルス感染者等情報把握・管理支援システム (HER-SYS) によると⁵⁾、当初 COVID-19 で特徴的とされた味覚・嗅覚障害の有症状者における頻度は、2021 年 1 月に 17.0% だったのに対し、 α 株パンデミック時 (2021 年 5 月) には 9.3% に減少している (表 1)。すなわち、第 4 波以降、一般的

表1 嗅覚・味覚障害の頻度の推移 (2021年)

月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月
頻度	17.0%	13.6%	12.8%	9.9%	9.3%	9.2%	8.8%
代表的な株	従来株		R.1		α		δ

文献5より引用改変

図1 PCR法, 抗原検査, 抗体検査におけるSARS-CoV-2検出の経時的変動モデル⁶⁾.¹ 感染時より積極的にフォローアップし検出される場合がある。² 鼻咽腔拭い液PCRの結果が、陽性より陰性の可能性が高い。

な感冒との鑑別がより困難となったことを示唆している。ただし、 δ 株については α 株より嗅覚・味覚障害がやや多い傾向があり(α 株が8.0%に対し、 δ 株が9.8%)⁵⁾、今後検討の必要がある。

(2) 検査適応の基本的な考え方

SARS-CoV-2の潜伏期間は2~14日で、典型的な例では、図1に示すとおり、発症時点ですでに最も感度が高いとされる鼻咽腔PCR検査の定量値(すなわち検出されるウイルスのコピー数)がほぼピークに達しており、この時期には、やや感度の点で劣る簡易検査でも検出が期待される⁶⁾。検査法の検出感度は、概ね“RNA抽出して核酸検査(RT-PCR)”>“簡易核酸抽出による核酸検査(ダイレクトPCR)”≈“定量抗原検査”>“定性抗原検査”の順⁷⁾である一方、簡易抽出による核酸検査や抗原検査では、検体の状況により偽陽性となる場合がある。

これらの臨床経過や検査法についての情報に基づき、新型コロナウイルス感染症対策分科会から、COVID-19に対する検査の基本的考え方が示されている⁸⁾。それによると、有症状者、無症状濃厚接触者ともに、鼻咽腔、

鼻腔からの拭い液を検体とする核酸検査法(PCRなど)、あるいは検査室で行われる定量抗原検査法が、診断のための検査として推奨され、一方、定性抗原検査の適応は限定的(抗原発現の多い発症前後の時期のみ)とされる。さらに、無症状者については、濃厚接触者かどうかにかかわらず、鼻咽腔拭い液あるいは唾液を検体とした核酸検査、定量抗原検査が推奨される一方、鼻腔拭い液による検査は採取されるウイルス量が少ないため勧められていない(表2)。検査結果が陰性でもCOVID-19が強く疑われる場合には、他の検体や検査法による再検査を行う必要がある⁹⁾。

(3) 重症度分類と評価

厚生労働省の主導のもとに作成された“新型コロナウイルス感染症(COVID-19)診療の手引き”⁴⁾では、酸素飽和度と臨床状態によって重症度が定義されている(表3)。有症状者のうち、最終的に(多くの場合7日程度で)約15%は中等症Ⅱ、約5%は重症に移行するが、軽症から急激に重症化するケースもあることが報告されている¹⁰⁾。重症化予測は、特にプライマリ・ケアの現場では重要であり、予後予測スコアがすでに活用されてい

表2 COVID-19に関わる各種検査とその対象者および検体

		核酸検出検査			抗原検査 (定量)			抗原検査 (定性)		
		鼻咽腔	鼻腔	唾液	鼻咽腔	鼻腔	唾液	鼻咽腔	鼻腔	唾液
有症状者	発症から 9日目以内	○	○	○	○	○	○	○	○	× ¹
	発症から 10日目以降	○	○	—	○	○	—	△	△	× ¹
無症状者 ⁴		○	—	○	○	—	○	— ³	— ³	× ²

濃厚接触者は、有症状、無症状のそれぞれの対応に準ずる。

¹ 研究中 ² 研究予定 ³ スクリーニングに使用可能. 陰性の場合は核酸検出検査や抗原定量検査を行う

○: 推奨される △: 陰性の場合は核酸検出検査や抗原定量検査を行う

—: 推奨されない

⁴a 感染リスク及び検査前確率が高い (クラスター, 医療機関, 高齢者施設等)

b 感染リスク及び検査前確率が低い (海外渡航時, スポーツ, 文化芸能 / 社会・経済を円滑に維持するため, 一般市民の安心のため)

文献8より引用改変

表3 重症度分類

重症度	酸素飽和度	臨床状態
軽症	SpO ₂ ≥ 96%	呼吸器症状なし/咳のみで呼吸困難なし, 肺炎所見なし
中等症 I	93% < SpO ₂ < 96%	呼吸困難あり, 肺炎所見あり
中等症 II	SpO ₂ ≤ 93%	酸素投与が必要
重症		ICU 入室/人工呼吸器が必要

文献4より引用改変

る⁴⁾ほか, COVID-19患者の血清および免疫学的マーカーを用いた重症化予測に関するメタ解析が報告¹¹⁾されている。それによると, (表4), ICU入室のオッズ比は白血球(WBC)増加(オッズ比=5.21), 好中球増加(オッズ比=6.25), およびDダイマー増加(オッズ比=4.19)で特に高く, 死亡率が高いとされるのは, 上記の好中球増加(OR=6.25), Dダイマー増加(OR=6.36)に加え, CRP増加(OR=7.09), IL-6増加(OR=13.87)であった。なお, COVID-19の重症化マーカーとして, 我が国では中等症IIの症状を示す1~3日前に上昇するとされるIFN-λ3および中等症IIに至る症例で持続的に低値を示すとされるTARC(Thymus and Activation-Regulated Chemokine)¹²⁾が保険適応となっている。とくに軽症者の入院受け入れが困難な地域もある現状では, プライマリ・ケアの現場で, 簡便かつ迅速に結果が得られるルーチン検査(WBC, CRP, Dダイマーなど)を有効に活用すべきであろう。

(4) 画像検査の適応

胸部CTは胸部単純X線撮影と比較して肺炎の早期診断や合併症の有無, 鑑別診断に有用であるとされるが, 所見の特異性や院内感染リスク, 被曝量の点からその利用には配慮が必要である。関連学会によるガイドラインでは, 酸素化が必要な中等度以上の肺炎が疑われる場合や, PCR検査陽性で重症化リスクが高い場合などを除いて, 胸部単純X線撮影を基本とするよう勧められている¹³⁾。とくに, 診断のためのスクリーニング検査へのCT検査の運用については, PCR検査陽性でもCT陰性例が存在(有症状例の20%)すること¹⁴⁾, CT所見に他疾患とのオーバーラップがあることなどから推奨されていない¹³⁾。画像検査の選択については, 個々の症例や医療機関の準備状況などから判断することが求められる。なお, 画像所見の詳細については, 総説¹⁵⁾を参照されたい。

表4 重症化マーカー

臨床検査項目	重症化* (オッズ比)	ICU入室 (オッズ比)	死亡率 (オッズ比)
白血球	3.14	5.21	5.21
好中球	2.62	29.1	6.25
Dダイマー	3.97	4.19	6.36
PT	1.82	2.18	3.19
IL-6	2.10		13.87
プロカルシトニン	4.76		5.70
CRP	6.36		7.09

PT：プロトロンビン時間，IL-6：interleukin-6，CRP：C-reactive protein

*胸部X線検査，臨床検査，症状により重症度を決定

文献11より引用改変

3. 診断確定のための検査-ウイルスの検出 (表5)

(1) 検体採取

検体採取の適切な実施は，臨床検査において最重要事項のひとつである。診断検査のための検体としては，ウイルスの細胞内への侵入の足がかりとなるACE2が鼻咽腔および肺胞上皮細胞に発現するため，鼻咽腔拭い液が推奨されている⁸⁾。ただし，single cell RNA シークエンシングや洗練された免疫組織染色による最近の報告では，鼻咽腔におけるACE2発現細胞は2~6%のみで巣状に分布していることが示されており¹⁶⁾，拭い液採取の際は鼻腔内の広い範囲からの採取が望ましい。個人防護服などの適切な使用による二次感染対策のうえ，侵襲を最小限にしつつ偽陰性を防ぐよう，適切な手技により採取する必要がある。

当院では，定量PCR検査に供されるすべての検体で，ヒト・ハウスキーピング遺伝子発現量チェックによる品質評価を行っており，最近の集計では有症状例5553件のうち，9件が気道上皮細胞を含まない不適切検体として再採取が行われている。なお，当院では，唾液検体はウイルス量が鼻咽腔検体よりも少ない¹⁷⁾ため，原則的に検査を受け付けていない。各種検査に適した検体については表2をご参照いただきたい。

(2) 遺伝子 (核酸検出) 検査

PCR検査は，新興感染症のパンデミックの際，病原体ウイルスゲノムが単離・同定されれば容易に運用を開始できることから，診断のためのゴールドスタンダードとなっている。バイオインフォマティクスの進歩により，検体に混在するヒトゲノムなどとの非特異的応答をあらかじめ防止することも容易となっている。

1) 定量RT-PCR法：SARS-CoV-2のようなRNAウ

イルスの場合，逆転写 (reverse transcription, RT) によりcDNAを合成し，それをPCRに供するRT-PCR法が利用される。PCR産物を蛍光標識で検出し，標準試薬の希釈系列より作成した検量線を利用して定量値を算出するのが定量 (リアルタイム) RT-PCRで，PCR産物の検出に相補鎖を持つプローブを利用する“プローブ法”が汎用されている¹⁸⁾。2本鎖のPCR産物を蛍光標識する従来法に比べ，より高い感度・特異度が担保され，5コピー程度のウイルス定量が可能となっている。なお，2段階のPCRを行い，2回目 (nested PCR) のPCR産物をリアルタイムPCRにより検出した上で，結果を陽性・陰性で返す簡易的な迅速検査 (FilmArray[®]，GeneXpert[®] など) が上市されている。

2) LAMP法，TMA法などの等温核酸増幅法：複数のプライマー (6領域を認識する4種類のプライマーなど) を用いることにより，等温で遺伝子を増幅させる方法で，Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法や Thermomechanical Analysis (TMA) 法がある。遺伝子増幅効率が高く，反応が30~40分と短時間で施行でき，使用している施設も多いが，測定機器が必要なことや定量検査ができない，プローブ法などに比べ感度が低い，といった短所がある。

(3) 抗原検査

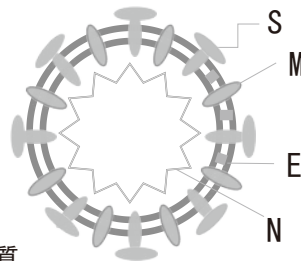
SARS-CoV-2の構成成分であるNucleocapsid (N) タンパクやSpike (S) タンパク (図2A) を，抗原抗体反応により検出する。簡便な定性検査 (イムノクロマト法) と，自動分析機器による定量検査 (自動分析法) があり，後者の方が感度は高い (表6) ため，唾液検体や無症状者でも使用される。いずれも特異度は高いが，検出感度は100コピー程度までで，5コピー程度まで検出できる核酸検出検査より劣るため，有病率が低い集団検診では

表5 当院で施行された主な SARS-CoV-2 検出検査の比較

方法	抗原検査 イムノクロマト法	核酸検出検査			
		RT-PCR 法 (nested PCR 法)	RT-PCR 法 (nested PCR 法) FilmArray®	RT-PCR 法 (プローブ法) GeneXpert®	RT-PCR 法 (One Step, 感染研 プローブ法) ¹⁸⁾
RNA 抽出	—	必要	不要 (装置内)	不要 (装置内)	必要
検査時間	15~30 分	約 5 時間	約 1 時間	約 1 時間	約 2 時間
結果	定性	定性	定性	定性	定量
検出限界 (ウイルス量)	100 コピー	10~100 コピー	5 コピー程度	5 コピー程度	数コピー
測定機器	キット	汎用機器	専用機器	専用機器	汎用機器
処理数	随時	数検体	2 検体 (当院)	8 検体 (当院)	30~45 検体*
長所	短時間 簡便	特異度が高い	簡便 感度・特異度が高い パネル検査	簡便 感度・特異度が高い	感度・特異度が高い 定量検査 多検体処理可能 柔軟な運用 検体の品質評価ができる 精度管理が容易
短所	感度が低い 偽陽性が多い	熟練が必要 長時間	コストが高い 精度管理が煩雑 検体の品質評価が できない	精度管理が煩雑 検体の品質評価が できない	多検体の処理や精度管理 に熟練が必要

*当院における SARS-CoV-2 検出は、1 検体に対し N, N2, GAPDH の領域を対象にしているため、1 回につき 30 検体、3 回/day、90 検体/day としている。

A



S: スパイクタンパク質
E: エンベロープタンパク質
M: マトシックスタンパク質
N: ヌクレオカプシドタンパク質

B

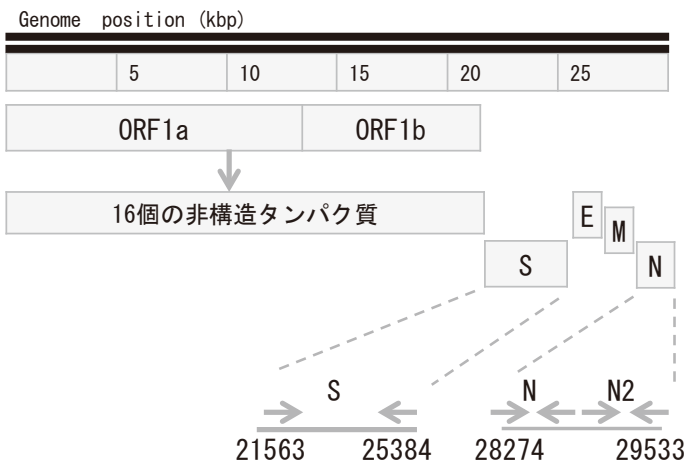


図2 SARS-CoV-2 ウイルスの模式図 (A) とゲノムの構造 (B)²⁵⁾.

A, SARS-CoV-2 は S: スパイクタンパク質, E: エンベロープタンパク質, M: マトリックスタンパク質, N: ヌクレオカプシドタンパク質を持ち、29,900 塩基の RNA ウイルスである。B, PCR 検査で検出されるのは、特異性の高い構造タンパクをコードする 4 つの遺伝子 (S, E, M, N) のいずれかである。ORF 領域は 16 個の非構造タンパク質 (酵素など) がコードされる。

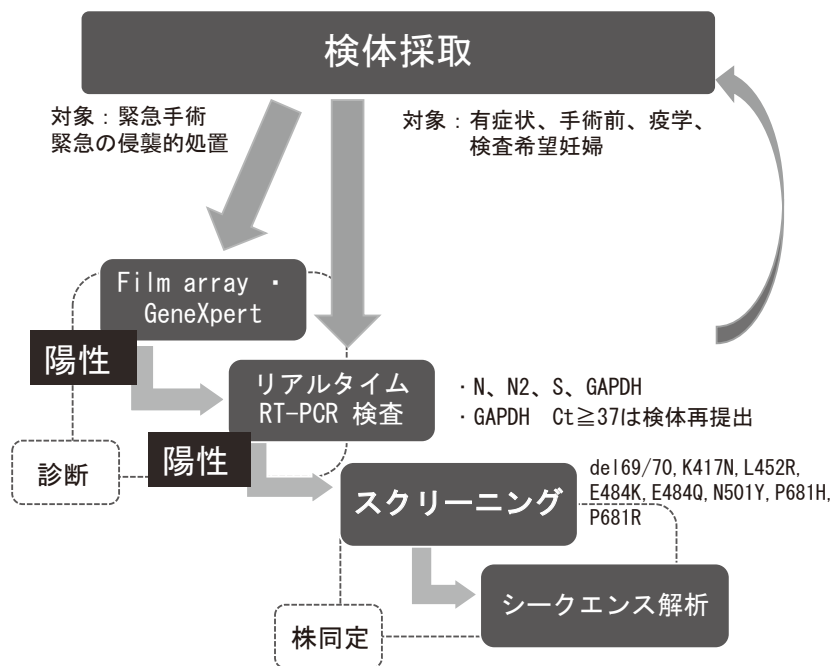


図3 当院における SARS-CoV-2 遺伝子検査の流れ。

偽陽性に関する対応が必要である。例えば、定量検査においてカットオフ値付近で陽性となった場合、定量 PCR による確認が必須である。

(4) 抗体検査

肝炎ウイルスなど、様々なウイルス感染症の診断に利用される抗体検査については、発症後に抗体が検出されるまで2~3週間かかること(図1)、検査試薬開発にかかる時間とコストの点でPCR検査の方がはるかに有利なため、今のところCOVID-19の診断目的のための使用は限定的である。一方、諸外国ではワクチンのブースター接種が話題となっており、本邦でもワクチン接種の効果推定の情報として今後活用されると考えられる¹⁹⁾。

4. 獨協医科大学病院における COVID-19 関連検査の運用

当院では、2021年8月現在、PCR法を主軸としてCOVID-19関連検査を運用している(表5)。当院における検査の流れを図3に示す。日勤帯の有症状者の診断や、手術前患者のスクリーニングには定量RT-PCR検査が施行され、緊急の侵襲的処置・手術が必要な患者や当直帯の救急対応には24時間体制で迅速PCR検査の施行が可能である。当院では、迅速PCR検査陽性となった検体は、定量RT-PCR検査にて陽性の確認とともにコピー数を評価している。つまり、当院で陽性判定された検体については、全てのケースで定量値が明らかにされており、フォローアップ検査により、定量値の経過

が追跡可能である。さらに、定量RT-PCR検査陽性の検体は、ウイルス株の同定を目的に、PCR変法による変異パネル検査やシーケンス解析を施行している。

(1) 診断のための検査

1) 定量RT-PCR検査：2020年2月にCOVID-19疑い症例が当院に入院したため、当院で豊富な経験のあるnested PCR法を利用したSARS-CoV-2検出検査を立ち上げ、当院初症例の診断に至った。しかし、nested PCR法(表5)は結果判明までの時間の長さや作業の煩雑さが問題となり、同年3月からは国立感染症研究所から提供を受けたプライマー、標識プローブ、および標準試薬を用いた定量RT-PCR法(プローブ法)を新たにセッティングした。なお、COVID-19関連PCR検査は、2020年3月に保険適応となったが、その条件として、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル¹⁸⁾に準じた自家調製検査法、あるいは認証を受けた体外診断用医薬品(検査試薬メーカーの提供する試薬キット)のいずれかを利用する必要がある。当院の定量RT-PCR検査は、精度管理の点で融通が効き、運用コストも抑えられる自家調製検査法である。当初手作業で行っていた核酸抽出も同年5月に自動化され、定量PCR対応機器2台の導入、技術トレーニングによる人材確保の結果、2021年8月現在、有症状者、手術前患者、疫学調査などを対象に、1日90検体(公称)まで検査可能な体制となっている。

PCRで検出する標的遺伝子については、ウイルスの

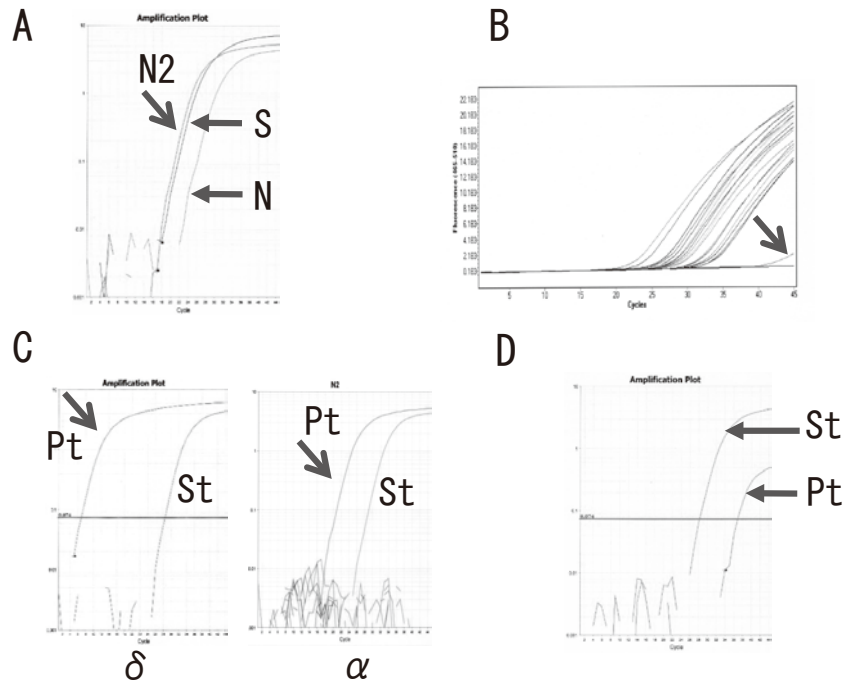


図4

定量 RT-PCR 増加曲線の例。自験例を示す。A, 同一検体における N, N2, S の比較。N2 の立ち上がり最も早く (Ct 値が小さい), 感度が $N2 > S > N$ であることがわかる。B, 内部コントロール *GAPDH* の増加曲線と外れ値 (矢印。Ct 値 = 42)。精度管理上 $Ct \leq 37$ を検査適合検体のカットオフ値とし, それを満たさない場合には検体再提出の依頼をしている。C, 発症時 (初回) 検査における δ 株と α 株の増加曲線 (N2) の比較。 δ 株の方が α 株より Ct 値が著明に小さく, ウイルス・コピー数が多い (約 10,000 倍) ことがわかる。D, 定量値 5 コピー/反応未満の増加曲線 (N2)。この検体では, 最も検出感度の高い N2 で標準試薬と同様の反応効率で増加が認められたため, “陽性” と判定されたが, 定量値については精度が保証できる範囲外であった。Pt, 患者検体; St, 標準試薬 (500 コピー/反応)。

変異に対応するため, 2 遺伝子領域以上を検出することが望ましい¹⁸⁾とされている。当院では運用開始当初より N, N2 の 2 つの領域 (図 2B) の検出を行っているが, “変異株” と騒がれた α 株のパンデミック時 (2021 年 5 月) には S 領域の定量検査のセッティングも完了している。図 4A に示すように検出感度は N2 領域の PCR のほうが N 領域のそれより高く, 有症状者には特異性を担保するため N, N2 の両者を, 術前患者には感度の高い N2 のみをスクリーニングとして検査し, 正確さと作業効率, 経済効率をともに向上させている。

当院における定量 RT-PCR 法では, 予め定量値が判明している標準試薬 (500 コピー) を検体と同時に定量し, 検査前に標準試薬の希釈系列から設定した換算式をもとに定量値 (コピー/反応) を報告している。標準試薬の定量が各アッセイで施行されることにより再現性が担保される。

また, 内部コントロールとして, ヒトのハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phos-

phate dehydrogenase) の定量も行い, 上気道の上皮細胞を含む検体採取, および RNA 抽出から PCR にいたる検査工程の質を確認している。図 4B に示すように *GAPDH* の Ct 値が 97.5 パーセントイル (カットオフ値 37) を超える検体に関しては, 検査工程や検体の質が担保されていない可能性があるため, 再検査ないしは検体の再提出を依頼している。N2 領域の PCR が陰性となった検体で *GAPDH* が外れ値となり, 検体再提出の結果, SARS-CoV-2 が真の陰性であることが判明した例は, 2021 年に入って 5553 件中 9 件あった。ちなみに, 後述の迅速 PCR 検査では, ヒト細胞由来の内部コントロールを評価しないため, このような不適切検体による偽陰性の確認を行うことができない。

2) 抗原検査: 上記の定量 PCR 検査は, まとまった検体数の処理が前提でルーチンの運用時刻が決まっており, 迅速性に関しては不利である。そこで, 2020 年 4 月に簡易的な抗原検査であるエスプライン SARS-CoV-2[®] が迅速検査のために導入 (表 6) され, さらに

表6 SARS-CoV-2 抗原検査, 抗体検査の感度/陽性一致率・特異度/陰性一致率

製品名	企業名	検査法	感度/陽性一致率	特異度/陰性一致率
抗原検査 (簡易キット)				
エスプライン SARS-CoV-2	富士レビオ	定性 ICT	37.0%	97.8%
イムノエース SARS-CoV-2/ キャピリア SARS-CoV-2	タウンズ	定性 ICT	76.2%	100%
抗原検査 (自動分析装置)				
HISCL SARS-CoV-2 Ag	シスメックス	定量 CLEIA	54~84%	100%
抗体検査 (自動分析装置+簡易キット)				
Elecsys Anti-SARS-CoV-2 RUO	ロシュ・ダイアグ ノスティックス	定量 ECLIA	100%	99.81%
ARCHITECT アナライザー用測定試薬	アボットジャパン	定量 CLIA	100%	100%

文献 26 より引用改変

2020年12月には、測定時間が15分と短縮されたイムノエース SARS-CoV-2/キャピリア SARS-CoV-2[®] (表6)に変更となったが、後述のPCR迅速検査の導入にともない抗原検査の依頼数が激減したため、2021年7月31日を以って院内検査は中止された。

3) 迅速PCR検査: FilmArray[®]検査は、検査室外での (Point-of-Care) 病原体遺伝子検査を指向したマルチプレックスPCR法で、事前のRNA抽出の必要がなく、プライマーセットの選定により様々な運用が可能な定性検査である。当院ではプライマーセットとして“呼吸器パネル”を導入しているが、その標的遺伝子には、SARS-CoV-2のSとM領域 (図2B)のほか、気道感染症の原因として一般的なインフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、ヒトライノウイルス/エンテロウイルス、マイコプラズマ・ニューモニエ、クラミジア (クラミドフィラ)・ニューモニエ、および百日咳菌の計21種が含まれる。作業的には簡便で、検査所要時間も短い (1時間程度) が、処理件数は劣る (同時に2検体まで)。当院では2020年12月より、緊急の侵襲的処置が必要な患者を対象に24時間体制で対応してきた。しかし、COVID-19診断では定量RT-PCR法とほぼ同等の性能を有する²⁰⁾にもかかわらず、多種のウイルスをターゲットとしたパネル検査のためコストの面で劣ること、精度管理がアウトソーシングとなり効率が悪いことなどから、2021年9月1日より、代替検査として自動遺伝子解析装置 GeneXpert[®]の運用を開始した。

GeneXpert[®]検査は、FilmArray[®]と同じく Point-of-Care を指向した RT-PCR による定性検査で、SARS-

CoV-2のみ (ターゲットはEとN2領域; 図2B) を検出する検査試薬キットが利用可能である。RNA抽出が不要で手作業が少なく、検査所要時間が約30分と迅速に結果判定ができる。E領域のみ陽性の場合には、SARS-CoV-2を含むサルベコウイルス亜族全般の可能性があり、別法で再検査を行う必要がある。

当院では、上記の迅速定性検査で陽性が出た場合の全例について、定量RT-PCR法による再検査を行い、定量値を報告している。2021年8月までに、FilmArray[®]で偽陽性が疑われた検体は2件あるが、精査の結果、定量RT-PCR法との明らかな解離は認められなかった。そのうち1件はワクチン接種後の偽陽性の疑い (FilmArray[®]でS領域を検出。ルーチンの定量RT-PCRはNおよびN2領域がターゲットなので検出されず)、もう1件は定量PCRとFilmArray[®]のために別途採取された2検体の検査結果の解離で、それぞれの検体を別方法で検査しても結果は変わらなかったことから、原因として、ウイルスの巣状な分布の可能性が示唆された。

(2) ウイルス株の同定のための検査

1) スクリーニング検査 (変異パネル検査): SARS-CoV-2は年間15~30塩基程度の変異をきたす²¹⁾ウイルスで、S領域の変異による伝播力の変化やワクチンの効果への影響はよく知られている。当院では、院内感染防止の観点から、PCR検査で陽性となった検体については、原則として全例でS領域の変異株同定のためのスクリーニング検査 (TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel, Applied Biosystems) を施行している。定量RT-PCR法と同じくプローブ法を利用しており、野生型を認識するプローブと変異型を認識するプローブを混

表7 懸念される変異株 (Variants of Concern, VOCs)

WHO 呼称/感染研 VOC	Pango Lineage	S 領域の主な変異
アルファ (α)	B.1.1.7	del69/70, del144, <u>N501Y</u> , A570D, D614G, <u>P681H</u> , T716I, S982A, D1118H
ベータ (β)	B.1.351	D80A, D215G, del241/242/243, <u>K417N</u> , <u>E484K</u> , <u>N501Y</u> , D614G, A701V
ガンマ (γ)	P.1	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, <u>E484K</u> , <u>N501Y</u> , D614G, H655Y, T1027I
デルタ (δ)	B.1.617.2	T19R, G142D, E156G, del157/158, <u>L452R</u> , T478K, D614G, <u>P681R</u> , D950N

下線は、当院における変異パネル検査で検出可能な変異を示す。

合して PCR を行い、両者の増幅のキネティックスの比較により変異の有無を判定している。2021年8月現在、国立感染症研究所が VOCs に分類した株が有する変異 (del69/70, K417N, L452R, E484K, E484Q, N501Y, P681H, P681R; 表7) を検査対象としており、検出された変異の組み合わせから、1時間程度で変異株の判定ができる。第5波の要因である δ 株は、その感染者のウイルス検出量 (コピー数) が従来株よりも1000倍以上多く (図4C) ウイルス排出期間も長い²²⁾とされるが、当院では第5波のピークの時期にも α 株検出例を複数経験している。変異パネル検査により迅速に株の同定が可能となっており、感染制御や診療の一助となることが期待される。

2) ゲノムシーケンス解析：当院臨床検査センターでは、2021年4月より栃木県の依頼を受けて、3500Dx ジェネティックアナライザー[®]を用いたサンガー法によるシーケンス解析を行っている。RT-PCR 検査で陽性と判定された検体からあらためて PCR で S 領域を増幅し、サンガー法にて配列を決定している。得られたシーケンスをリファレンス配列 (NC_045512.2) と比較し、S 領域における変異を検出している (N501Y の検出例を図5に示す)。前述の変異パネル検査に含まれない変異を検出することも可能である。

なお、我々の解析では、2021年4月に SARS-CoV-2 PCR 陽性症例7例中4例は R.1 (感染研 VOIs に該当)、残り3例は従来株と判定した。しかし2週間程度を経た第4波ピーク時には、検出された6例すべてが α 株となり、その伝播性の高さが裏付けられた。一方、非定型の変異が検出された変異株バリエーションの割合は60%を超え、現在その病的意義に関して、各種データと比較しながら検討を行っている。

(3) 経過観察のための PCR 検査

当院では、陽性患者について、定量 RT-PCR 法でフォローアップを行っている。経過中、PCR 産物が全く検出されず“陰性”と判定されても、数日後の検査で

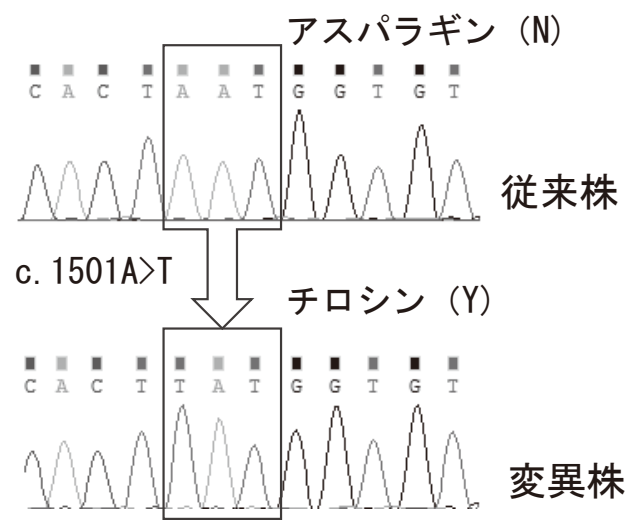


図5

サンガー法による SARS-CoV-2 ゲノム解析の例。ボックス内は、 α 株に認められる N501Y を示す。

PCR 産物が検出され、コピー数は少ないながら陽性になることがしばしばある。特に軽症者や無症状キャリアの場合、PCR 検査陰性化が退院や自宅療養解除の判定に影響を与える場合がある²³⁾ため、定量 RT-PCR の結果が“5 コピー未満”で PCR 増幅が認められる場合 (図4D)、別領域の PCR や別機種で再検を行うなど、慎重に判定を行っている。まれに、おそらくほぼ不活化・断片化されたと推測されるウイルス RNA 検出の事例 (検出感度の低いはずの N 領域の増加効率が、検出感度の高い N2 領域の増加効率より高いなど) を経験することがある。

厚生労働省の退院基準は発症から10日間で検査は必要ないと言われているが、当院の職場復帰基準は医療機関であることを考慮し定量 RT-PCR が2回連続で陰性としている。

(4) COVID-19 関連検査の検査提出状況

当院では、2020年8月から2021年8月までに、定量 RT-PCR 検査 (初回検査、再検査を含む) を16,879

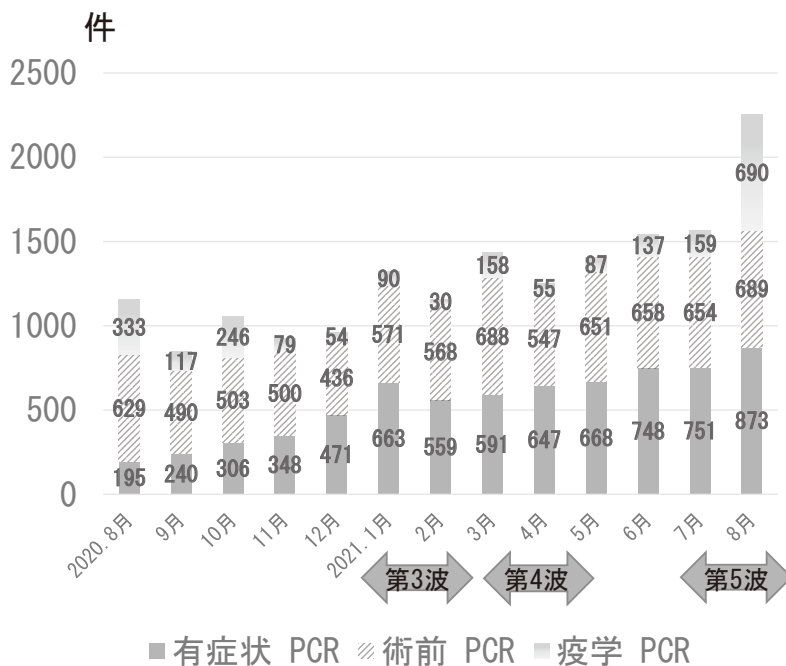


図 6

当院におけるリアルタイム RT-PCR 検査数の推移 (調査期間 2020 年 8 月～2021 年 7 月)。第 3 波以前は 1 日平均 40 件前後だったが、第 5 波 (2021 年 8 月) で倍増 (1 日平均 80 件) した。

件、抗原検査を 676 件、また、2020 年 12 月から 2021 年 7 月までに FilmArray[®] 検査を 991 件施行した。第 3 波や第 4 波にあたる期間に有症状者の検査数は増加し、それに追従する形で濃厚接触者を含むクラスター検索の検査数 (積極的疫学調査) が増加している。とくに第 5 波に相当する 2021 年 8 月の検査数が最多 (1 日平均 80 件) で、 δ 株の伝播力の強さを反映していると考えられる。一方、術前患者を対象にした検査数は、手術件数に大きな変動がなく、集計期間内で横ばいであった (図 6)。

5. まとめ

COVID-19 の診断には、SARS-CoV-2 の伝播力や病原性の強さから、症状の有無にかかわらず病原体の検出検査が必須であり、現時点では、検査性能の点で PCR 検査がゴールドスタンダードとなっている。核酸検出自体の検査精度は定量 PCR 法が研究手法として普及し始めた 20 年ほど前²⁴⁾ とは比較にならないほど進歩しており、当院の経験では、複数の核酸検出検査の“結果不一致”の原因は、多くの場合検出反応や検出機器ではなく検体自体にあった。ただし、定量 PCR 検査でウイルスが検出されなかったとしても、その結果は提出された検体にウイルス RNA が含まれていなかったことを示すにすぎず、被験者の鼻咽腔にウイルスが存在しないことと

“同値”ではない。とくに初診時やスクリーニングの際は、適切な手技による鼻咽腔拭い液採取により、臨床的な疑陰性を防止する努力が求められる。また、臨床所見と明らかに一致しない結果が得られた場合には、別検体による再検が必須である。

2021 年 8 月現在、COVID-19 症例の多くは δ 株だが、汎用されるワクチンの効果がより減弱するとされる λ 株や μ 株が国内で同定され、今後新規変異株によるパンデミックの可能性も十分に考えられる。確実な検体採取や多検体の処理には熟練した手技が必要であり、それらに長けた人材の育成も含め、余力ある検査体制の構築が急務であろう。

文 献

- 1) WHO : Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/2021>.
- 2) 国立感染症研究所 : 感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の新規変異株について (第 7 報). <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/10220-covid19-36.html2021>.
- 3) 厚生労働省 : 第 49 回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザリーボード資料 1 直近の感染状況等の分析と評価. 2021.

- 4) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 診療の手引き・第 5.2 版. <https://www.mhlw.go.jp/content/000815065.pdf2021>.
- 5) 厚生労働省：第 47 回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザーボード 資料 2-5 HER-SYS データに基づく報告. <https://www.mhlw.go.jp/content/109000/000818356.pdf2021>.
- 6) Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A : Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* **323** : 2249-2251, 2020.
- 7) Kobayashi R, Murai R, Asanuma K, et al : Evaluating a novel, highly sensitive, and quantitative reagent for detecting SARS-CoV-2 antigen. *J Infect Chemother* **27** : 800-807, 2021.
- 8) 病原体検査の指針検討委員会：新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針・第 4 版. <https://www.mhlw.go.jp/content/000788513.pdf2021>.
- 9) 日本臨床検査医学会：新型コロナウイルス感染症検査の使い分けの考え方 (第 2 版). <https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20210127-1.pdf2021>.
- 10) 東京都. 第 61 回 東京都新型コロナウイルス感染症モニタリング会議資料 03 専門家によるモニタリングコメント・意見 : <https://www.bousai.metro.tokyo.lg.jp/taisaku/saigai/1013388/1015408.html2021>.
- 11) Elshazli RM, Toraih EA, Elgaml A, et al : Diagnostic and prognostic value of hematological and immunological markers in COVID-19 infection : A meta-analysis of 6320 patients. *PLoS One* **15** : 2020.
- 12) Sugiyama M, Kinoshita N, Ide S, et al : Serum CCL17 level becomes a predictive marker to distinguish between mild/moderate and severe/critical disease in patients with COVID-19. *Gene* **766** : 145145, 2021.
- 13) 日本放射線科専門医会, 日本医学放射線学会, 日本環境感染学会, 日本感染症学会. : 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する胸部 CT 検査の指針 (Ver.1.0). https://jcr.or.jp/covid19_2020/0423_ct_ver_1-0/2020.
- 14) Inui S, Fujikawa A, Jitsu M, et al : Chest CT Findings in Cases from the Cruise Ship Diamond Princess with Coronavirus Disease (COVID-19). *Radiol Cardiothorac Imaging* **2** : e200110, 2020.
- 15) 藤田次郎：臨床像：呼吸器内科の立場から—感染症と特発性間質性肺炎の接点. *日本内科学会雑誌* **109** : 2290-2296, 2020.
- 16) Ortiz ME, Thurman A, Pezzulo AA, et al : Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *EBioMedicine* **60** : 102976, 2020.
- 17) Williams E, Bond K, Zhang B, et al : Saliva as a Non-invasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* **58** : 2020.
- 18) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf2020>.
- 19) 日本臨床検査医学会：COVID-19 における抗体検査についての基本的な考え方. <https://www.jslm.org/committees/COVID-19/20200417-1.pdf2020>.
- 20) Creager HM, Cabrera B, Schnaubelt A, et al : Clinical evaluation of the BioFire (R) Respiratory Panel 2.1 and detection of SARS-CoV-2. *J Clin Virol* **129** : 104538, 2020.
- 21) Nextstrain : Genomic epidemiology of novel coronavirus-Global subsampling. <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?l=clock>.
- 22) Li B, Deng A, Li K, et al : Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. 2021.
- 23) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の軽症者等に係る宿泊療養及び自宅療養の対象並びに自治体における対応に向けた準備について. <https://www.mhlw.go.jp/content/000618525.pdf2020>.
- 24) Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, et al : Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Cancer Res* **64** : 415-422, 2004.
- 25) Cui J, Li F, Shi ZL : Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17** : 181-192, 2019.
- 26) 日本医師会：COVID-19 関連検査一覧 2020 年 8 月 28 日改訂. <https://www.covid19-jma-medical-expert-meeting.jp/wp-content/uploads/2020/09/C0160101-COVID-19検査まとめ-20200822-【検査一覧公開版】.pdf2020>.