

COVID-19 診断における検査について

高橋 聡

はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染による感染症を新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) とし, SARS-CoV-2 の検出が診断の要件となる。感染が確定した症例としては, 症状を有する患者と, 症状を認めないが濃厚接触者に病原体の検出が行われた無症状病原体保有者に区別される¹⁾。症状を有する者に対しては, 疑い患者の要件¹⁾として, 発熱または呼吸器症状を呈し, かつ, COVID-19 が確定した者と濃厚接触歴がある, 流行地域に渡航または居住していた, 流行地域に渡航または居住していた者と濃厚接触歴がある, さらに, 症状などから医師が COVID-19 を疑う, などがあげられている。いずれにしても, 最終的には病原体診断が重要であり, 現状では, 核酸増幅法検査と抗原検査が実施されている。本稿では, COVID-19 の診断に欠かせない検査の現状と今後の展望について解説したい。

検査の対象は?

検査は, 疑い患者に対して実施される。また, 濃厚接触者で迅速に診断が必要な場合, そして, 医療関連施設内での COVID-19 患者の発生により接触歴が特定できない場合の職員と入院患者などに実施される。病院では, 全身麻酔の比較的高侵襲, 鼻腔・鼻咽頭・口腔内に関連, COVID-19 を否定できない, などの場合には手術前に検査を実施している。

検体の種類は?

検査に用いる検体は, ウイルス量が多いとされている下気道由来検体 (喀痰もしくは気管吸引液)^{2,3)} が好ましいとされているが, 採取が困難である場合が多いので, 鼻咽頭ぬぐい液がもっとも多く用いられている。唾液についても発症から早い時期であれば下気道検体と遜色ないとの報告⁴⁾により検体として用いられているが, 鼻咽頭ぬぐい液よりも検出感度は劣るとの報告⁵⁾もある。また, 自己採取による鼻腔ぬぐい液も検査に有用とされている^{2,6,7)}。

検体採取時の問題点は?

検体採取時には, 検体の種類によって, 採取する医療者の曝露予防が必要になる。検査を行う医療者は, 気管吸引液採取と鼻咽頭ぬぐい液採取時には, 接触予防策と飛沫予防策を講じる必要があり, ゴーグル (またはフェイスシールド), N95 マスク, 手袋, 長袖ガウン, キャップなど个人防护具 (Personal protective equipment; PPE) を装着する。原則として PPE は, 一人の検体採取ごとに交換するため, 採取ごとに PPE 交換の手間と時間がかかり, 現場では汗が吹き出してきて, それなりの労力を要する。一方, 自己採取による唾液と鼻腔ぬぐい液では, 医療者の N95 マスクは不要になるが, 感染疑い者への対応ではサージカルマスクとゴーグル (またはフェイスシールド) は必須であり, 検体の受け渡しには手袋を装着する。唾液については, 食物残渣を残さないようにすることが必要で, 時間をかけて口の中にたまった 1~2 mL 程度の唾液 (唾ではない) を採取する。鼻腔ぬぐい液は, 医師の監視下に 2~3 cm の綿棒を前鼻孔に挿入し 5~10 秒をかけて鼻粘膜に沿って綿棒を回転させ, 同じ綿棒をもう一方の前鼻孔で繰り返して回転させ, 輸送液が入った滅菌スピッツ管に入れる⁶⁾。

検体の輸送は?

検体採取後は, 速やかに検査を開始する。検体の輸送が必要な場合には, 検体採取後は氷上または 4°C で保管する。輸送開始までに 48 時間以上かかる場合にはマイナス 80°C 以下で凍結保存する。ただし, マイナス 80°C の冷蔵庫がなければマイナス 20°C で保存する²⁾。

SARS-CoV-2 検出と症状発現との関係は?

今後修正されることがあるかと思うが, 現在のところ, 症状が発現した時には, 下気道検体と鼻咽頭ぬぐい液からの核酸増幅法で SARS-CoV-2 検出はされ, 発症の数日前から検出可能と考えられている。呼吸器検体からのウイルス分離は症状発現の数日前から発現後 8 日前後まで可能とされている。抗体については, 症状発現後 8 日程度で IgM 抗体と IgG 抗体がほぼ同時に上昇するとされている⁸⁾。また, 発症の 19 日以内に検討したすべて

の症例でIgG抗体が認められたとの報告⁹⁾がある。ただし、無症状病原体保有者では、かつ、一部の有症状者においても、一度上昇したIgG抗体が低下していくとの報告¹⁰⁾もある。

SARS-CoV-2検出の核酸増幅(遺伝子増幅)法とは？

我が国では、国立感染症研究所からリアルタイムRT-PCR法による検査法(感染研法)¹¹⁻¹³⁾が示され、当初はこの方法で検査を実施することとなった。当院検査部においても、感染研法を用いて訓練し、検査を始めた。しかし、この後に使用可能となった検査法と比較して、煩雑であり操作過程も多いことから、現在は使用していない。

感染研法の習熟と同時にロシュ・ダイアグノスティクスから提示されたTaqManプローブを用いたリアルタイムone-step RT-PCR法(ロシュ法)¹¹⁾も実施が可能となった。当院検査部においては、ロシュ法のほうが比較的操作しやすいとの判断で、初期には主たる検査法とした。

その後、新規に開発された核酸増幅法検査について、残余検体を用いた研究を行った。その一つが、国立研究開発法人産業技術総合研究所および杏林製薬が共同開発したGeneSocの導入支援である¹⁴⁾。そしてもう一つが、現在、当院検査部の主たる検査法としている島津製作所のAmpdirect Technology 2019新型コロナウイルス検出試薬キット(島津キット)である。この方法は、相当に神経質にならざるを得なかった感染研法とロシュ法のRNA抽出過程を簡素化し、その他の作業も簡素化され、検出までの時間も短縮可能とした。当院検査部の検査技師は核酸増幅法検査を数種類経験していたが、彼らにもっとも好まれた方法であった。そして、今後、別稿で解説されるプレジジョン・システム・サイエンスのgene LEADを使用した検査法評価の臨床研究を予定している。他に、栄研化学のLAMP法を用いた検査試薬、ベックマンコールターのGeneXpertを用いた検査試薬なども開発され、核酸増幅法検査として実用化されている。

抗原検査とは？

抗原検査には、抗原定性検査と抗原定量検査があり、いずれにもCOVID-19の確定診断に使用可能となっている。

抗原定性検査は、富士レビオで開発を行った、特別な機械や装置を必要としないイムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法(enzyme immunoassay; EIA)を組み合わせた原理による検出試薬で簡易キットとして実施する。一次抗体および二次抗体としてSARS-CoV-19のN抗原を認識するモノクローナル抗体を用いる。検査の対象は、

発症から9日目以内の有症状者であり検体は鼻咽頭ぬぐい液を用いる。

抗原定量検査は、同じく富士レビオで開発を行った試薬であり、全自動化学発光酵素免疫測定システム(ルミパルスG1200など)で測定する。原理としては、抗体結合粒子に結合した抗SARS-CoV-2マウスモノクローナル抗体と検体中に含まれるSARS-CoV-2抗原による免疫複合体の形成、そして、抗SARS-CoV-2マウスモノクローナル抗体を介して結合した検体中のSARS-CoV-2抗原とアルカリフォスファターゼ標識抗SARS-CoV-2マウスモノクローナル抗体(酵素標識抗体)による免疫複合体を形成、反応後、発光量を測定する。自動化機器による測定であり、抗原定性検査と比較すると検出感度が向上している。現在、さらに検出感度を向上させた抗原定量検査を開発中である。この抗原定量検査については、発症から9日目以内の有症状者では鼻咽頭ぬぐい液と唾液のいずれでも検体として使用可能である。また、発症から10日目以降では鼻咽頭ぬぐい液を検体とする。無症状者では、鼻咽頭ぬぐい液と唾液のいずれでも検体として使用可能である。

抗原検査では、核酸増幅法と比較すると検出感度が劣ることから、抗原検査で陰性であってもCOVID-19を否定はできず、場合によっては核酸増幅法で確認する必要がある。

検査結果の解釈は？

この生物工学会誌の読者の方は、巷で行われている実りのない議論に呆れているのではないかと拝察する。ここまで紹介してきた検査法の結果の解釈については、おそらく、世間一般の方は正確に認識されていないかもしれない。

現在、もっとも広く実施されている核酸増幅法では、検査時点のSARS-CoV-2のRNAが検出されるかどうか、検査結果である。大まかなウイルス量はcycle threshold(ct)値により計算ができるが、検体の状況にも左右される。感染直後にはSARS-CoV-2が検出されない可能性があり、その時点で陰性であっても感染を否定できない。また、検査時点では感染していなくても、明日には感染するかもしれない。つまり、核酸増幅法検査の結果は、検査時点にしか適用されないということになる。さらに、我々がもっとも恐れるのは、その時点での陰性結果を受けて、感染していないとして行動してしまい、逆に感染源となる可能性、そして、感染が広がる契機となる可能性である。このような点を補うためには毎日続けて検査する必要がある。毎日、検体を採取する医療者がいて、

受け付け、報告書を作成して、お返しする。毎日の検査が現実的だろうか？我々が、病院職員全員や学生全員に核酸増幅法検査を行わないのはこのような理由による。国民全員に核酸増幅法検査を行っていない理由も同様であると考えている。

検査件数を増やすためには？

検査が必要な者は、基本的には有症状者であり、検査前確率が高い場合に実施されるべきである。しかし、意思疎通の悪さなのか、地方衛研や保健所の体制のためか、医師が帰国者・接触者相談センターに検査を依頼しても、SARS-CoV-2検査をしてもらえないという声が多くあった。流行初期には何回も電話をして、ようやく検査をしてもらって陽性だったという事例もあった。必要な有症状者には検査をするのが今のCOVID-19診療体制である。感染者はどういう形であれ隔離される。このような状況では、当院に搬入される救急対応の患者への対応が困難と考えたので、当院検査部では2月下旬には臨床検査技師8人を選抜した遺伝子検査担当により24時間体制とした。当院検査部には技術的に確立されている臨床検査技師が勤務し、検査機器も揃っていた。検査件数を増やすという行政側の希望が報道されているが、ここで本来すべき議論は、検査件数を増やすためには、機器や試薬のみではなく、実際に操作するのは検査技師であると認識すること、そして、そのような検査技師を育てるということであろう。医療従事者不在の議論は、あらゆる場面で遭遇する。病床数は確保した、との発表がされているが、その病床に入院する患者を診療する医療従事者にも思いを寄せられないものか……。同じ病床でも、高齢者が入院した場合と若者が入院した場合には、同じ医療が行われるわけではなく、高齢者への医療にはより濃厚な対応が必要になる。つまり、一つの病床は、状況によっては一つではないということである。いずれにしても、検査は、必要な有症状者には実施されるべきであり、検査体制が不十分であれば検査体制を拡充すべきであると考ええる。

一般の無症状者には検査を行う必要がない訳だが、同じ無症状であってもCOVID-19と診断された感染者の濃厚接触者に対しては検査を行う場合もある。接触の関係が完全に把握できる場合には自宅待機で健康観察をしてもらい、症状発現時に検査を行う。しかし、病院や高齢者施設で職員、患者、入所者が発症した場合には、その動線を完全に把握することが困難で濃厚接触者の特定ができない場合もある。そのような状況では、病院や施設内での迅速な感染対策を進めるために職員、患者、入

所者に対して可能な限り検査を実施することも検討される。場合によっては、検査対象が数百人にも及ぶ状況で、その地域の検査体制が脆弱であれば検査結果が得られるまでに時間を有し、二次感染、三次感染の危険性が高まる。そのためにも検査体制の充実が必要になる。当院検査部では自治体の要請を受けて、相当数の検体を1~2日以内に検査を実施し迅速に結果を報告している。検査体制の確立は、地方衛研や保健所のみで行うことは現実的ではなく、病院や検査センターと共に行っていく体制を行政が調整するべきであろう。

検査の問題点は？

核酸増幅法検査では、検体間の汚染、特に、RNA抽出過程における汚染があり得る。特に、多数の検体を処理する場合にはある確率で生じうる。我々も多数の検体を処理した場合に、RT-PCR法検査の基線が不安定であったり、増幅・検出時の基線の立ち上がりが通常とは異なる角度であったり、cutoff値付近のct値となることを経験している。そのような場合には、結果が疑わしいとして、まずは検査結果を返さず、保留とする。そして、作業台を徹底的に清浄処理し、その検体のみで抽出からやり直し、先に行った検査試薬での検査と、別の検査試薬での検査を同時に行い、結果を確認する。結果が陰性であれば偽陽性であったと判断している。

当院検査部では、24時間体制で検査を実施していることから、救急搬入された患者、院内で発熱した患者・職員、職員がCOVID-19と診断された場合の濃厚接触者、自治体からの検査要請検体、などで検査を行っている。他院よりも検査の障壁が低いと、時に気楽に検査を依頼してくる場合がある。感染リスクもなく、明らかな症状もないが……。という場合もあることから、検査部へ依頼する前に、検査提出理由の説明が必要になる。無条件でどんどん検査を依頼されることは臨床検査技師の疲弊につながり、前述した検体の汚染や検査体制の崩壊に至る可能性がある。そのため、検査が必要な場合には検査部長である筆者に理由を連絡することを必須条件としている。この連絡も24時間いつでも受ける体制である。このような気構えがなく、一般の臨床検査と同じような体制の検査となれば、積もり積もって医療崩壊の一因となるだろう。重症者の急増のみが医療崩壊の原因ではない。

検査の今後は？

COVID-19の病態が解明されていくことで、検査の対象を選択することができるようになるだろう。検査の結果についても、ある程度の定量性が確立されることで、

感染性の有無を明示できるようになれば、隔離の必要性の有無をも判断できるだろう。

COVID-19の検査の議論により、臨床検査技師の存在感は確固たるものになり、今後の遺伝子検査領域においても重要な担い手として期待されることになるであろう。

最後に、COVID-19との戦いにおいて、検査に携わるものとして、我々の専門性を存分に発揮し、検査の開発や改良に邁進していきたい。

文 献

- 1) 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2版2020:
<https://www.mhlw.go.jp/content/000631552.pdf> (2020/7/29).
- 2) 国立感染症研究所 2019-nCoV (新型コロナウイルス) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル (2020/07/17 更新版):
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/coronavirus/2019-ncov/2518-lab/9325-manual.html> (2020/7/29).
- 3) Wang, W. *et al.*: *JAMA*, **323**, 1843 (2020).
- 4) To, K. K. W. *et al.*: *Lancet Infect. Dis.*, **20**, 565 (2020).
- 5) Williams, E. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **58**, e00776-20 (2020).
- 6) Tu, Y. P. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, DOI: 10.1056/NEJMc2016321 (2020).
- 7) Wehrhahn, M. C. *et al.*: *J. Clin. Virol.*, **128**, 104417 (2020).
- 8) Sethuraman, N. *et al.*: *JAMA*, DOI: 10.1001/jama.2020.8259 (2020).
- 9) Long, Q. X. *et al.*: *Nat. Med.*, **26**, 845 (2020).
- 10) Long, Q. X. *et al.*: *Nat. Med.*, DOI: 10.1038/s41591-020-0965-6
- 11) 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> (2020/7/29).
- 12) 国立感染症研究所 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検査法の運用についてのガイドライン 第3版 (令和2年4月17日):
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/COVID-19-PCR-test-practical_R3.pdf (2020/7/29).
- 13) Shirato, K. *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **73**, 304 (2020).
- 14) 経済産業省 News Release (2020年3月31日):
<https://www.amed.go.jp/content/000061280.pdf> (2020/7/29).