

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17302

研究課題名（和文）コロナ禍及び災害時における迅速臨時検査室の確立

研究課題名（英文）Establishment of on-site temporary PCR testing methods.

研究代表者

小山 哲秀 (KOYAMA, Akihide)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90622209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：オンサイトPCR検査ができるシステムの構築を行なった。これにより施設に出向いてのPCR検査が可能になり、災害時にも検査が可能であることが示される。まず、オンサイトでのPCR検査は可能であった。PCR検査前の抗原検査では全員が陰性だったが、qPCR検査によって2名の陽性患者が認められた。次に、災害時に必要な検査体制の検討を行ない、バッテリーによるqPCR検査が可能であることを示した。さらに、ダイレクトPCR検査の検討を行なったところ検査室と同等の検査結果が得られる可能性が示唆された。日本は災害が多く起こる国である。今後、オンサイトでのqPCR検査が活躍する場面が来るかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

必要な現場でPCR検査を行うことには本邦が抱えている問題を解決しうる可能性を秘めている。すなわち、医療体制を維持するために検査と医療を別に行うことが出来ることで、医療現場の負担を軽減できるかもしれない。また、災害が多く起こる本邦において、避難所での検査が感染の拡大防止にも寄与できるかもしれない。今後コロナ禍と同じような感染症が起きうる可能性がある中で、医療体制を維持するための検査法として活躍が期待できる。また、平時においても、さらに小さいコミュニティにおける集団感染などにも対応が可能であり、検査する人と機材が現場に移動することで検査を行うという新しい検査法の提唱につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：A system has been developed to enable on-site PCR testing. This enables PCR testing to be carried out on site at the facility and shows that testing is feasible even in the event of a disaster. First, on-site PCR testing was possible: all patients tested negative for antigens prior to PCR testing, but two positive patients were identified by qPCR testing. Next, a study was conducted to determine the testing regime required in the event of a disaster, showing that battery-operated qPCR testing was feasible. Furthermore, a direct PCR test was examined, and it was suggested that a test result equivalent to that of a laboratory could be obtained. Japan is a country where many disasters occur. On-site qPCR testing may be used in the future.

研究分野：法医学

キーワード：定量PCR 感染症検査 オンサイト検査 新型コロナウイルス 災害医療

1. 研究開始当初の背景

2020 年初頭に世界中で拡大した新型コロナウイルス感染症は、これまでの常識を一変させた。本邦では 2023 年 5 月に「新型インフルエンザ等感染症(2 類相当)」から「5 類」になるまでの約 3 年半の間に多くの経験をする事となった。

新型コロナウイルス流行時において、ワクチンによる予防と検査が広く一般的に知れ渡ることになった。本研究では、検査法について検討を行うことにした。検査法には大きく分けて 2 つの方法である、抗原検査法と核酸増幅検査(PCR)法が挙げられる。とりわけ定量 PCR(qPCR)による検出法は、米国疾病予防管理センターの報告においても“Gold Standard”とされており¹⁾、広く社会に認知される検査法となった。一般的に、簡便で短時間に結果が得られる定性抗原検査法と比較して、感度や特異度の面で精度が高いことが強みであり、多検体処理を可能としていることから、とりわけ集団に対する検査法として適していると言える。加えて、一般的な抗原検査法と比較して、核酸をターゲットとしているため、短時間で検査法の確立が可能であり、流行初期から検査法として活躍をした。

一方で、定量 PCR を行うために必要な高精度測定装置のほとんどは据え付け装置であり、価格も概ね数百万円と高価であるため、基本的には、検体を現場で採取し、機器が設置されている検査室に検体を持ちこんで運用する。平時の検査であれば特段問題は生じないが、検査所から遠方になればなるほど検体輸送に費やす時間が増えることで、検体採取から報告までのダウンタイムが問題として挙げられる。このことは、検査処理件数が限られ、交通手段が十分でない、とりわけ地方都市が抱える大きな問題である。実際に、申請者が新潟県から依頼された新型コロナウイルスを対象とした検査を実施していた際にも、検体数が増加した際には、検体採取から報告まで数日かかることがあった。

別の視点で検査を考えると、災害大国である我が国において、災害時に避難場所や福祉施設などでの感染対策も今後の重要な問題点として挙げられる。一般的には、災害時における避難場所等での感染対策として、手指消毒や咳エチケットの注意喚起等を提示し、自治体レベルでも“密にならない対策”が話し合わせ実践されているが、災害時にどこで、どのように検査を行うのか?ということについては十分に考えられておらず、具体的な方策を考える局面を迎えていると感じた。もし、未知の感染症と大地震などの災害が起こった時にどうすべきかを考えたとき、必要な時に臨時的に検査所を迅速に設置できること、その際には、通常の検査室と同等の検査体制を整えることが重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、2 つの目標に対して検討を行った。第 1 に感染流行時における臨時 PCR 検査所の確立を目標として検討を行った。第 2 に災害時に必要な PCR 検査所の確立に向けた検討を行った。

3. 研究の方法

● 小型 PCR の選定

臨時 PCR 検査所に使用可能な定量 PCR(qPCR)装置の検討を行った。近年、小型定量 qPCR 装置は近年多数上市されているが、その性能は、主に小型化による精度(感度)面や一度に処理できる検体数が機器によって異なる。そこで、最新機器と遜色がない点を考慮しつつ、持ち運びが可能でメンテナンスフリーである携帯利便性や、通信を利用してのリモート機能がある機器を選定することにした。それらの点を網羅している機器として、米国 BMS 社の Mic qPCR cyclers(以下、Mic と記載する。Bio Molecular Systems)の利用を検討した。Mic は、先に挙げた精度面・携帯利便性・リモート機能に優れており、本構想と同様のコンセプトを考へて作られた装置である。実際に多くの空港やアフリカの移動検査室、大型旅客船やオーストラリアの奥地等でその有用性が示されている²⁾。本機器を用いて移動式 qPCR 検査を実施することとした。

● 出張 PCR 検査の実施

離島である新潟県佐渡市に機材を持ち込み、検体採取から qPCR 検査までの確認、Mic qPCR cyclers による同時多検体処理の検討、リモートによる遠隔地(新潟市と佐渡市)からのデータ確認を行った。なお、本検討については、新潟県医療調整本部(当時)に実施に関する説明を行い、ご理解いただいた上で、ご協力を得て実施した。Mic の搬送には、エース株式会社の協力を得てスーツケースを改良した機内持ち込み可能な専用のケースを作成していただき使用した。RNA の抽出には Nextractor®NX-48S(Genolution Inc.)を使用し、qPCR に関わる試薬の輸送には IceBattery®(アイ・ティ・イー株式会社)を使用した。RNA 抽出時には、MS2 phage を添加し、これを内在性コントロールとした。なお、検体の処理に関わる部分においては、簡易クリーンベンチ内で作業を実施した。qPCR の測定試薬には、TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用い、Primer と Probe はアメリカ疾病予防管理センターが公表した配列(N2, FAM probe)と、国立感染症研究所が公表した配列(NIID-S2, HEX probe)を SARS-CoV2 の検出用に用い、MS2 phage を検出する配列を Cy5 に設定し、3 つのターゲットを検出するマルチプレックス qPCR 法により実施した。なお、Primer と Probe については IDT(Integrated DNA Technologies)社から購入した。

● 災害時に必要な PCR 検査体制の検討

災害時に必要な qPCR 検体測定可能件数を、1 日に 184 件(1 回の qPCR に測定可能な検体数は、陽性コントロールと陰性コントロールをそれぞれ 1 検体ずつ除いた 46 件となる)とし、4 回 PCR を施行で

きることを条件として検討を行った。まず、必要な電源の確保のため、EcoFlow RIVER 2 Max (エコフローテクノロジー、バッテリー容量 512Wh、重量約 6.1kg) を準備し、必要回数の PCR が可能であるかどうかを検討した。次に、RNA 抽出が不要となるダイレクト PCR が可能な試薬の検討を行った。検討には、熱変性やバッファーの作用により核酸抽出がなされる SARS-CoV-2 Lysis Buffer Ver.2 (Fujifilm wako)、iSWAB microbiome-EL (Mawi DNA Technologies LLC)、PrimeTime™ one-step 4x broad-range master mix (IDT) の 3 種類の試薬を用いた。検体には唾液に対して陽性サンプルを添加量を変えて加え、Nextractor®NX-48S を用いた RNA 抽出法と Ct 値の比較検討を実施した。Fujifilm 社と Mawi 社による核酸抽出は、マニュアルに従って処理を行い、その後の qPCR 反応は TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix を使用した。IDT 社の試薬は、検体を直接反応液中に混和させ、マニュアルに従って PCR 反応を行った。

4. 研究成果

● 実際に行われた出張 PCR 検査の結果

出張検査は、2022 年夏に新潟県佐渡市内で発生したクラスターに対応するために行われた。前日に、新潟県医療調整本部から出張の可否について問い合わせがあり、対応可能であると判断して準備を進めた。当日は、医療調整本部からの支援として DMAT 隊員 1 名に同行していただき、新潟港よりカーフェリーに乗船し、13 時 30 分ごろ施設に到着した。施設では検体を採取し、17 時 30 分頃に佐渡保健所に検体が搬送された。

次に、保健所内の一室をお借りして、簡易検査所を設置した(図 1)。なお、同保健所内には検査施設があり、オートクレーブで滅菌

処理することが可能であることを確認した上で実施した。検査は、施設対象者分と、当日市内から急遽依頼のあった検体 180 件を対象として 19 時 30 分から開始し、22 時まででに半分の検査を終了し一旦終了とした。翌日は、8 時から検査を再開し、10 時 30 分までに追加検体を含む全検査を終了した。検査に要した時間は約 5 時間であった。

PCR 検査前に行われた抗原検査では全員が陰性であったこともあり、施設では少々緊張感が低下した雰囲気を感じつつ検査を実施した。PCR 検査の結果、2 名が陽性であった(陽性となった Ct 値は、N2 FAM と NIID-S2 HEX 共に約 26 と 30 程度を示した)。念のために、Ct 値が 30 だった方を対象に、翌日に検体を取り直して再検査を実施したが、再検査の Ct 値も 30 であり、陽性と判定した。後日談として、施設に対して必要な人員の派遣支援が決定され、継続的に検査をした結果、数日後に全員が陰性となった。

● 災害時に必要な検査体制の検討

まず、バッテリーの検討を行った。EcoFlow RIVER 2 Max の充電率を 100%(フル充電)にした上で、Mic を接続し、通常の qPCR 反応を行い、バッテリーの充電率を確認すると 80%であった。同検討を合計 4 回繰り返したところ、バッテリーの充電率は 18%であった。このことから、4 回の PCR 検査に十分対応可能であることが判明した。

次に、PCR 法の検討を行った。災害時に検査体制を構築するためには、必要最低限の機材に絞る必要がある。qPCR 装置を利用することを前提にしたとき、核酸抽出サンプルを対象とした qPCR は、手間が掛かることから現実的ではない。そこで、核酸抽出をせずに直接検体を qPCR 反応に利用可能な、いわゆるダイレクト qPCR 法を採用することにした。検討には、市販されていた 3 種類のダイレクト PCR 試薬を用いた。それぞれの試薬は、マニュアルに従って処理を行い、算出された Ct 値と、RNA 抽出法による一般的な qPCR を行い測定された Ct 値との相関性を検討した。

その結果、Fujifilm 法では CDC_N2: 0.969、NIID-S2:0.914、Mawi 法では CDC_N2: 0.958、NIID-S2:0.930 であり、IDT 法では CDC_N2: 0.984、NIID-S2:0.963 であり、概ね全ての試薬で良い相関性を示していた中で、IDT 社の Direct 法が最も相関性が高かった。また、RNA 抽出法との一致率を検討したところ、Fujifilm 法では 95.8%(RNA 抽出法と比較して 2 例陰性)、Mawi 法では 93.8%(RNA 抽出法と比較して 3 例陰性)、IDT 法では 97.9%(RNA 抽出法と比較して 1 例陰性)であった。なお、不一致例はいずれも RNA 抽出法による Ct 値が 30 を超えている例(RNA 抽出法の Ct 値: CDC_N2: 30.54, NIID-S2: 32.42, CDC_N2: 32.72, NIID-S2: 33.97, CDC_N2: 31.07, NIID-S2: 32.27)であった。

本結果を解釈する上で留意しなければならないこととして、RNA 抽出法とダイレクト法とでは、qPCR 反応に使用するサンプルの量が異なる点が挙げられる。本検討で用いた RNA 抽出法では、サンプル 100 μ L を用いて、最終的に 70 μ L の溶液に抽出を行うことで、単純に 1.4 倍程度濃縮された想定され、これを 5 μ L (検体量に換算すると 7 μ L) 使って PCR 反応を行った。一方、今回用いたダイレクト PCR 法による検討では、サンプルを 2.5 μ L 使って PCR を行った。したがって、RNA 抽出法の方が 2.8 倍量を多く PCR に使うことができる想定となる(これを Ct 値に換算すると約 1.5 になる)。この想定のもと、最もデータが良かった IDT 社のデータに補正をかける(単純に出てきた Ct 値から 1.5 引く)と、概ね良好な回帰直線を得ることが出来た。

以上の結果から、災害時には Mic qPCR 装置とピペット等が入ったスーツケースと約 500Wh の容量がある充電装置、ダイレクト PCR 試薬を持参することで、1 日に約 180 件の PCR 検査が可能であることが考えられた。



5. 考察

本報告書をまとめている 2024 年において、新型コロナウイルスに対する感染症法上の規定が 5 類になっており、実施者が向いて検査をできる体制が直ちに必要な状況にはない。しかしながら、流行期間中の問題点として、遠隔地からの検体搬送には時間がかかり、検査報告が翌日以降になることもあった。その点において、必要な検査機材を持ち込んで現地で検査出来るシステムを構築できることは、新しい検査スタイルであると言える。本検討では、コロナ禍だったこともあり、自施設での PCR 検査を優先させたため 1 回のみの実施に留まったものの、もし整備が整っていたとしたら、検査法の 1 手段として利用されたかもしれない。

今回使用した機器の特徴として、小型である点やキャリブレーション等のメンテナンスが必要無いことを考えると、これら機器を、拠点となる保健所等の施設で所有することが望ましいと考える。平時にはこれら機器を他の検査や研究、教育のために使用することが可能である。その際に、機器を使うことができる人材の育成にも利用することが可能であろう。また、緊急時には即時に必要な施設に機器を集めることで、まとまった数の検査が可能となる。本装置は、1 台の操作パソコンで最大 10 台の装置を稼働させることが可能である。また、本解析ソフトは無料でダウンロードが可能であるため、一般的なクラウドサービスを利用して別 PC でのデータ確認も出来る。例えば判断に迷う検査結果が出た場合には、遠隔地からも必要な助言が可能である。或いは、機器が使用できる人材が整っていれば、検体処理とデータ確認との人材を分けて、効率的に検査体制を構築も可能であると考えられる。

本検討のコンセプトである、検査を必要な現場で行うことのメリットは、担当者と検査者が会話できることも挙げられる。保健所の担当者とはデータを示しながら、なぜ再検査が必要なのか、再検査をすることでどんなことがわかるのかなど、検査をする側からの立場から意見を述べることができた。本方法が感染者の増加を通常よりも早く収束できたかどうかは、同様の事例を増やす必要があるが、少なくともその後の意思決定の一助にはなったのではないかと考えている。

次に、災害時における検査体制を構築した。本検討ではダイレクト PCR 試薬についての検討を行った。どの試薬も概ね同じような結果を得ることが出来た。本検討では、唾液を想定した検討を行ったが、検体はいろいろなものを想定する必要があり、更なる検討が必要である。また、不活化バッファーを使用した検体に対しては、バッファー中の物質が測定結果に影響を与えることが考えられるため使用することが出来ない点に留意する必要がある。

PCR による検査は、新型コロナウイルスに限らず、インフルエンザや RS ウイルスなど、流行や対象年齢を想定した上で検出系(プライマーやプローブ)を組み替えて検査ができる点や、プライマーとプローブを発注し、およそ 2 週間程度で検査体制が構築できる点は良い点として挙げられる。一方で、本検討で使用したようなダイレクト PCR の前処理試薬は、個別化で販売されていることが少ない。多くの場合、PCR 酵素やプライマー・プローブとセットで販売されている。新型コロナウイルスのように、検出するターゲットが絞られている時にはキット化されたものを利用することが簡便である。しかし、必要な期間を過ぎてしまうと使用用途がなくなってしまう。そこで、先に挙げたように、PCR プライマーやプローブを変えて使用できるようにすることで、キットを無駄にすることなく使用することが出来る可能性がある。また、ダイレクト PCR 検査においては、核酸抽出法とほぼ遜色のない結果を得られる可能性が示唆されたが、陰性、陽性はもちろんのこと、可能であれば再検査の基準値も含めて考えておくことが効率的な検査につながると考えられた。

まとめると、小型 qPCR 装置を利用した出張検査体制を整えることは可能であった。整えた方法であれば、どこでも検査室で行われる検査とほぼ遜色のない検査を行うことが可能であろう。今後新型コロナウイルスのような未知の感染症対策が再び起こらないとは限らない。大事なことは、苦い経験を繰り返さないことだと考える。今回構築した検査方法が新たな検査法の選択肢となれば幸いに思う。

Reference

1. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2, Update as of September 9, 2021
2. <https://biomolecularsystems.com/mic-is-ready-to-help-the-world-fight-covid-19/>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山 哲秀, 和泉 邦彦, 高塚 尚和, 高橋 昌
2. 発表標題 災害時に即応可能な迅速PCR検査の確立
3. 学会等名 第28回日本災害医学学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------