

薬学部に設置された 新型コロナウイルスPCRセンター

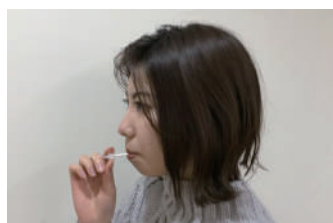
京都大学名誉教授・武庫川女子大学名誉教授
一般社団法人生命科学教育研究所・代表理事

いちかわ あつし
市川 厚
きのした けんし
木下 健司

1. はじめに

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症拡大状況下，2020年5月～11月にかけて，一般社団法人日本私立薬科大学協会理事会は，薬学部の教育環境の改善・充実，特に実務実習と大学キャンパスの安全・安心に資するため，薬学部が積極的にSARS-CoV-2のPCR検査に協力できないかについて検討しました。その背景に，薬学部はPCR装置があり研究目的に使用していることや感染症予防の教育研究もしていることなどの事情があります。その結果，一般社団法人生命科学教育研究所（大阪市）で開発途中にあった新規PCR検査技術を応用することになりました。

この検査法は新規性，簡便性及び迅速性に優れ，感度・精度共に現行法と遜色しないが，当協会として当該のPCRセンターを設置・運営はできないので，各大学に新規PCR検査法を紹介することとなりました。その後，この検査法は武庫川女子大学で採択され，2020年11月2日「武庫川女子大学PCRセンター」が薬学部内に開設され，運営されています（図1）。このPCRセンターは，発熱などの症状が認められない無症状者の学生，生徒，園児及び教職員等を対象に一斉検査（スクリーニング）を実施することで，大学内施設や国家資格取得（薬剤師，看護師，栄養士，介護士，教員など）の実習先施設内感染



スポンジで唾液を採集



唾液をチューブに移す



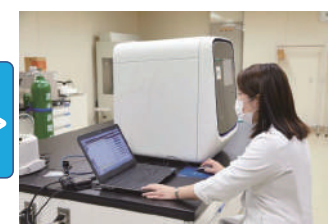
加熱による不活化



PVAスポンジ上に不活化唾液滴下



乾燥した検体のパンチ



リアルタイムRT-PCR測定

図1 武庫川女子大学PCRセンター

を未然に防ぎ、学生、教職員、並びに実習指導者らが安心して平常時の教育・研究や実技実習を始める環境づくりを支援することを目的としています。本稿は、一般社団法人生命科学教育研究所が開発した新規PCR検査法の特徴と武庫川女子大学PCRセンターの業務内容を紹介します。

2. 新規PCR検査法の特徴

2-1 PCR測定法の現状

SARS-CoV-2のPCR検査は、生体サンプル中のウイルスRNAをリアルタイムPCR装置により逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR; reverse transcription PCR)で定性的に測定します。PCR検査には以下の5ステップの操作があります。

1) サンプル採取方法

サンプル採取方法として鼻咽頭ぬぐい液法と唾液法があります。前者は医師、歯科医師等が行う医療行為であり、医師等の過剰負担が問題です。一方、唾液採取は個人が自由採取できる利点の一方、安全管理の問題があります。

2) ウイルス失活方法

ウイルス失活方法としては、酵素法、界面活性化剤法と加熱法があります。ウイルスRNAを検出する観点から界面活性化剤溶液(Triton X-100, Tween-20などを含有)又は検体を70~90℃で加熱してウイルスを失活させる方法が一般的です。

3) ウイルスRNAの抽出精製

一般的には、生体検体(鼻咽頭ぬぐい液又は唾液)から抽出精製キット(例えば、QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit RNA)を用いてウイルスRNAを抽出します。

4) ウイルスRNAのリアルタイムPCR検出方法

ウイルスRNAの検出方法は、ワンステップRT-PCRが主流で実施されています。逆転写酵素(Reverse Transcriptase)とDNAポリメラーゼ連鎖反応酵素(DNA Polymerase)混合した2酵素系と、逆転写活性(Reverse Transcriptase)とポリメラーゼ連鎖反応活性(Polymerase)を共に有する酵素を用いた、2種のワンステップRT-PCRによりPCR検査

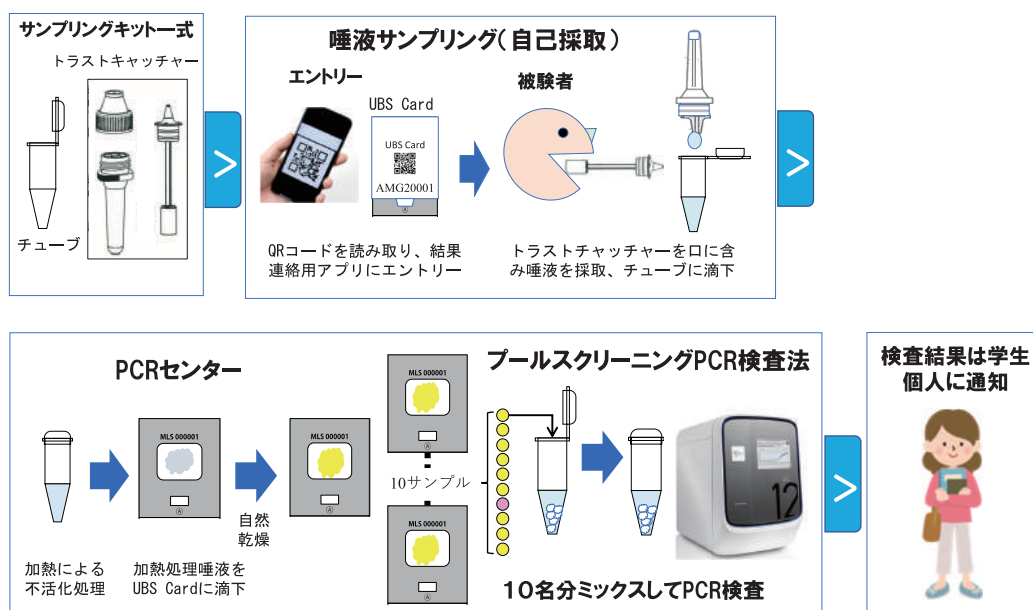


図2 新規PCR検査法操作手順の概要

されています。

5) 結果判定

結果判定は増幅曲線のCt値を基準にカットオフ値40サイクル以上を陰性と判定します。

2-2 新規PCR検査法操作手順の概要

武庫川女子大学PCRセンターで行われているPCR検査の操作手順は次のようになります(図2)。

〈手順1〉被験者は唾液を採取するデバイス「トラストキャッチャー」とエッペンドルフチューブの2点を受け取ります。トラストキャッチャーは、唾液を吸収するスポンジが棒状の先端に装着された治具とスポンジ部分から唾液を絞り出すための容器から成ります。被験者は先端のスポンジ部分を1～2分間、口に咥え、スポンジに唾液が十分に浸み込んだ後、スポンジ棒を容器に押し込み、容器内に搾取した唾液をエッペンドルフチューブに移します。

〈手順2〉エッペンドルフチューブ中の唾液は70℃ 15分間ヒートブロックで加熱処理します。これによりウイルスは失活します(大阪大学微生物研究所ウイルス制御学分野塩田達夫教授との共同研究)。

〈手順3〉不活化唾液検体は冷却保存後、シート状のPVAスポンジに滴下し、室温で乾燥し、ウイルスをPVAスポンジに固定化します。

〈手順4〉PVAスポンジシートから、直径1.0 mmの小片(検体)をパンチし、小片を直接PCR溶液中(富士フイルム和光純薬株式会社製:SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit Ver.2)に添加します。プールのスクリーニング方式の場合は、複数人(10人)の検体をPCR溶液に混ぜます。

〈手順5〉PCR検査はリアルタイムPCR装置QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System(サーモフィッシャーサイエンティ

フィック株式会社)で行います。結果判定は増幅曲線のCt値を基準にカットオフ値40サイクル以上を陰性と判定します。

〈手順6〉判定結果は、ICTシステムにより、個人情報完全に保護の上、検査結果が被験者自身に直接返却されます。

2-3 新規操作法の特徴

SARS-CoV-2感染症のPCR検査の課題は、操作の簡便性、多検体同時処理による迅速性、偽陽性・偽陰性の判定精度、検査結果情報の安全確保などです。武庫川女子大学PCRセンターでは、それらの課題は次のように解決されています。

1) PVAスポンジの使用

当センターでは、操作の簡便性を図るために、ウイルスの固定にPVAスポンジを用いています。PVAスポンジは容積の約90%以上が気孔で大変親水性に富んでおり、一般には洗車用のスポンジやスポーツ時に使用される吸水タオルなどに応用されています。また医療分野においては、骨細胞や肝細胞などの培養に応用した例が報告されています。PVAシートを応用して、血液・唾液などの生体検体を直接PCR反応液に添加して遺伝子検査する技術は特許済みです(一般社団法人生命科学教育研究所:特願2020-169947:試料分析方法)。

2) プールスクリーニング方式の適用

PCR検査は通常全数検査が行われます。しかし、サンプル数が多い場合全数測定をするには時間と費用に問題がある場合や検体の想定陽性率が低い場合に「プールのスクリーニング」方式が利用できます。この方法は、複数人の検体をPCR溶液に同時に添加して、一度に判定できます。しかし、デメリットは唾液などの液体検体を用いる場合には不向きで、検体数相当分の溶液がPCR反応液に混合されるので、反応液が希釈され、検出感

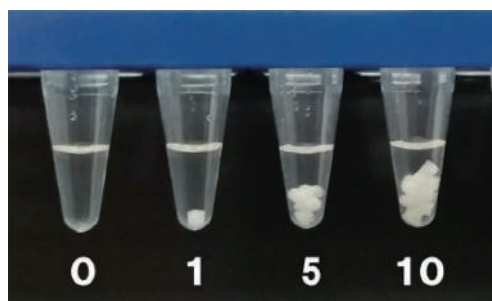


図3 プールスクリーニング法
(図中の数字：PCR反応液40 μ L中のPVA スポンジ小片数)

度・精度が低下するからです。武庫川女子大学のPCR検査では、固体のシート小片を反応液に投入するため、溶液添加の場合に生じる希釈による感度の低下はありません（図3）。96PCRチューブで10検体をプールして反応させた場合、960名分のPCR検査ができます。陽性の場合にはチューブに入れた10検体を展開して全数検査します。それゆえ、陽性率が低い多数の検体測定では、検査の効率化、労力、時間、PCR反応溶液のコストダウンが可能です。

3) 偽陽性・偽陰性の判定精度の工夫

武庫川女子大学のPCR検査で使用する富士フイルム和光純薬社製のSARS-CoV-2 PCR検査キットの場合、ウイルスRNA検出用のプライマーとプローブセットにインターナショナルコントロールのヒト由来ハウスキープ遺伝子である*RPL13A*のmRNAを検出するプライマーとプローブが含まれています。*RPL13A*のmRNAの結果が正常か異常かにより、ウイルスRNA測定結果の偽陽性、偽陰性の判定の精度を高めることができます。

4) PCR検査結果の情報管理ICTシステム使用

武庫川女子大学のPCR検査では、検体をICT管理してヒューマンエラーを少なくしています。また、個人情報保護された状態でPCR検査を進めます。検査結果はウェブを経由して直接本人に通知します。陽性者は、

武庫川学院健康サポートセンターからの指示を受けます。検査結果情報は武庫川学院健康サポートセンター、同総合情報システム部、地域保健所と共有します。

5) 被験者の個人情報と教育

1. 被験者は、PCR検査を受ける前に、SARS-CoV-2のPCR検査に関する諸説明（インフォームドコンセント）を受講し、同意書の作成（ウェブ上と紙ベースの2種類）を行います。ついで、スマートフォンの専用アプリをダウンロードして学籍・職員番号およびサンプリングキット番号を入力します。検体の管理はQRコードで行われます（図2）。
2. 被験者はサンプリングを行う前にSARS-CoV-2感染症に関する基礎知識、感染防御そしてPCR検査結果の返却方法およびその対応について約10分間のビデオによる事前教育を受けます。その後、サンプリング方法のビデオによる指示に従い唾液を自己採取します。PCR検査の陰性者は、「新型コロナウイルスに罹患しないことを保証するものではない」ことや「陰性証明書が感染対策をしなくてよい免罪符ではない」ことなどを理解します。

3. 謝辞

本稿は、現在、無症状感染者をいち早く発見するために、また、自身が感染、媒介する不安・重圧を受けている方々へ、安心を提供するために一般社団法人生命科学教育研究所*が開発したSARS-CoV-2の新規なPCR検査法と武庫川女子大学PCRセンターにおける運用状態を紹介しました。この機会を与えていただいた、東京都薬剤師会に深謝します。

* 〒533-0033

大阪市東淀川区東中島1-21-33 俵ビル702号室

Tel & Fax : 06-6195-2817