



〈特集：シンポジウム（第33回年次学術集会より）〉

感染症関連の遺伝子検査－SARS-CoV-2を中心に－

植柳 泰

Genetic testing for infection diseases －Focusing on SARS-CoV-2－

Yasushi Ueyanagi

Summary The spread of the COVID-19 epidemic has led to the rapid increase in genetic testing for SARS-CoV-2. For genetic testing, demonstrating the validity of the testing process through quality control is particularly important; this requires a correct understanding of the significance of the control samples used. Furthermore, actively participating in external quality control activities is necessary to confirm that the tests are being appropriately performed in the laboratory.

Key words: Genetic test, Quality control, SARS-CoV-2

I. はじめに

感染症検査における遺伝子検査は、患者検体中から感染症の原因となる細菌やウイルスなどの病原体に由来する核酸（DNAやRNA）を検出する目的で実施される。この遺伝子検査は、従来必要であった培養を介することなく病原体を検出でき、迅速な感染症の診断が可能となるなど、感染症検査において必要不可欠な検査法となっている。

2020年にsevere acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2: 新型コロナウイルス)の感染者が国内でも発見されて以降、流行を認め、2023年3月においても感染者が発生している状況である。新型コロナウイルス感染症の流行に伴い、遺伝子検査の検査数や検査体制の拡充が

求められ、今日では、新型コロナウイルス遺伝子検査は多くの手法、試薬が開発されている。本稿では新型コロナウイルス遺伝子検査のうち、RT-qPCR (reverse transcription-quantitative PCR)の原理や検査手法について概説し、感染症遺伝子検査の精度管理の注意点について述べる。

II. 新型コロナウイルス遺伝子検査の検査工程

新型コロナウイルスは、一本鎖RNAを持つRNAウイルスである。新型コロナウイルスのように、RNAをゲノムにもつ病原体の核酸検出には、RT-qPCR (逆転写-定量PCR)が広く用いられている。RT-qPCRの検査工程は「検体採取・検体保管」、「ウイルスRNA抽出」、「cDNA合成(逆

九州大学病院検査部
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

TEL: 092-641-1151 (内線5756)
E-mail: ueyanagi.yasushi.964@m.kyushu-u.ac.jp

Department of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine, Kyushu University Hospital,
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan.

転写反応)」、「定量PCR」に大別される (Fig.1)。ここからは各工程について説明する。

1. 検体採取・検体保管

RT-qPCRの検査工程の最初は、「検体採取・検体保管」である。感染症遺伝子検査では、標的となる病原体が多く存在する材料が検体として扱われる。新型コロナウイルスの場合、鼻咽頭拭い液や唾液、喀痰が用いられる。

前述の通り、新型コロナウイルスはRNAウイルスであるが、RNAはDNAに比べても特に不安定で壊れやすい。そのため、輸送容器の蓋をしっかり閉めて、環境中に存在するRNase (ribonuclease: RNA分解酵素) の混入を防ぐなど注意が必要である。また、検体採取後は検体保存液の種類 (輸送培地懸濁液、生理食塩水懸濁

液など) を問わず、速やかに氷上または冷蔵 (4℃) に保管することが推奨されており¹⁾、当検査部では、提出された検体は検査実施まで冷蔵 (4℃) 保管している。このように、検査実施者は、検体中のRNAが壊れないよう検体の質の確保に努める必要がある。

2. ウイルス RNA 抽出

次の工程は「ウイルスRNAの抽出」である。これは、ウイルスの外膜を壊してウイルスRNAを外に出し、外に出てきたウイルスRNAを抽出する工程である。

ウイルスRNAの抽出方法は、使用する抽出キットや試薬によって異なる (Table 1)。例えば、QIAamp Viral RNA Mini (キアゲン)²⁾ のスピンカラムを用いたRNA抽出では、検体中に含まれ

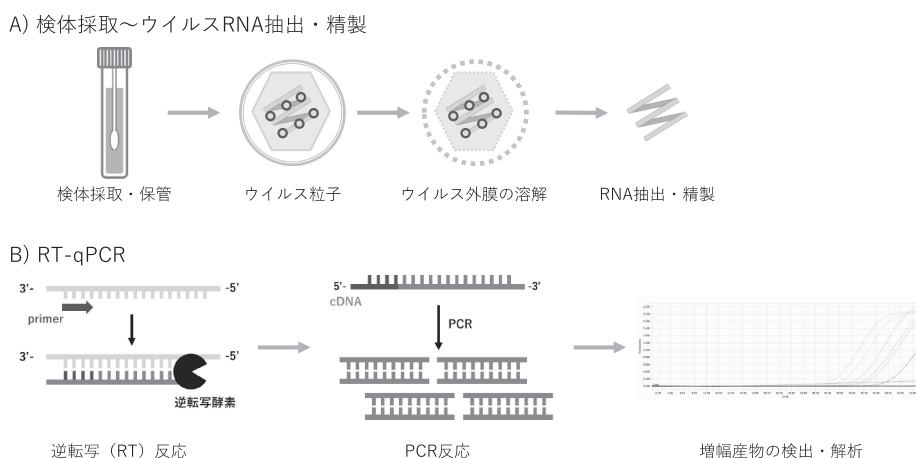


Fig. 1 新型コロナウイルス遺伝子検査の検査工程

Table 1 SARS-CoV-2遺伝子検査におけるウイルスRNA抽出方法

抽出キット・試薬	抽出法	特徴
QIAamp Viral RNA Mini (キアゲン)	スピンカラム法	<ul style="list-style-type: none"> ・所要時間30分程度 ・精製 (夾雑物の除去) まで実施 ・多検体の場合、検査実施者の負担大きい
SARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)	前処理液3μLに検体8μLを加えて95℃ 5分加熱	<ul style="list-style-type: none"> ・短時間で可能 ・多検体の処理に向いている
cobas® SARS-CoV-2 & Flu A/B (ロシュ・ダイアグノスティクス)	磁性ビーズ法	<ul style="list-style-type: none"> ・自動分析機内で実施 ・精製 (夾雑物の除去) まで実施

る夾雑物を取り除く「精製」まで行い、高純度のRNAを得ることが可能である。しかしながら、スピнкаラムを用いて多検体を処理する場合には、作業が煩雑となり検査実施者の負担は大きい。今日では、このウイルスRNA抽出・精製操作を必要としない測定試薬が開発されている。例えばSARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)³⁾では、前処理液と混和して加熱処理を行うだけで検体の前処理操作が済むため、簡便で迅速な検査が可能である。

自動分析機においてもウイルスRNA抽出は可能である。例えば、cobas®6800システム(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)では、ウイルス膜を溶解した後に磁性ビーズを用いてRNAを精製している⁴⁾。

3. 逆転写反応 (reverse transcription: RT)

ウイルスRNA抽出の次は逆転写反応である。逆転写反応とは、RNAから相補的な配列を有するDNA (complementary DNA: cDNA) を合成する反応である。PCR反応はあくまでDNAを対象とした増幅反応であるため、RNAのままでは増幅することはできない。そのため、ウイルスRNAが検査対象となる場合には、逆転写反応は不可欠である。

4. 定量 PCR

定量PCRとは、PCR反応と同時に、サイクル毎に増幅産物を検出・モニタリングする方法で

ある。増幅産物の検出方法はいくつかあるが、ここではTaqManプローブを用いる方法を例として示す (Fig. 2)。TaqManプローブ法は、蛍光物質とその蛍光を抑制するクエンチャーが修飾された検出プローブを用いる手法である。検出プローブは増幅産物に結合(アニーリング)するが、このときの蛍光はクエンチャーによって抑制される。続いて、伸長反応が起こるとプローブは分解されるが、このとき蛍光物質は、クエンチャーの抑制から解除されて蛍光を発する。この蛍光強度のモニタリングによって増幅産物の検出・モニタリングが可能となる。蛍光強度が一定の値(閾値)に達しなかった場合は、新型コロナウイルス陰性(増幅産物を認めず)と判断し、蛍光強度が閾値に達した場合は新型コロナウイルス陽性(増幅産物を認めた)と判定する。

ここまでRT-qPCRの原理を個別に説明したが、実際には、1つのチューブ内でcDNA合成と定量PCRを1stepで行う測定試薬が主流となっている。

Ⅲ. 遺伝子検査における注意点

PCRは、1個の鋳型DNAから100万倍以上に増幅することができる技術である。これは言い換えれば、本来陰性である検体に、鋳型となるウイルス遺伝子やPCR増幅産物が1コピーでも混入(コンタミネーション)してしまうと、増幅産物が検出され偽陽性となる危険性があることを意味する。そのため、新型コロナウイルスに限らず、

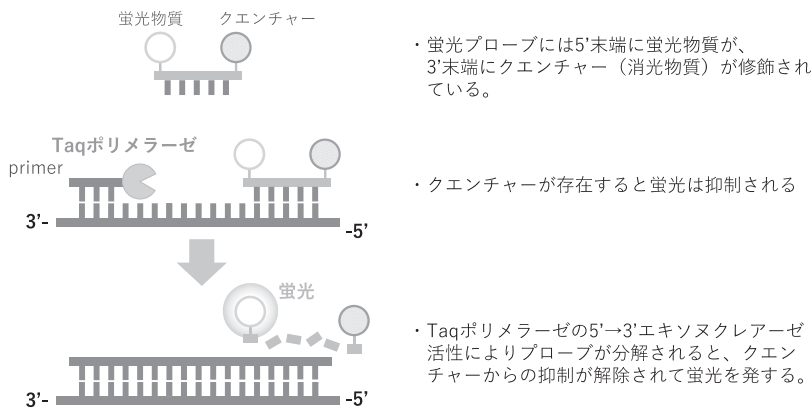


Fig. 2 Taqmanプローブによる増幅産物の検出

遺伝子検査では「コンタミネーション」は最も回避すべきトラブルである。

コンタミネーションの予防策の1つに「作業エリアの区分け」(Fig. 3)がある。具体的には「サンプル前処理 (RNA抽出)」、「PCR試薬調整」、「PCR試薬に試料を添加」、「PCR反応」を実施する部屋・区域を明確に分けることである。さらには、作業エリア (部屋) を分けるだけでなく、ピペットや試薬、手袋の行き来も禁止することが求められる。なかでも、PCR試薬へのコンタミネーションは避ける必要がある。当検査部では「PCR試薬調整」エリアへ検体試料を持ち込まないことはもとより、「PCR試薬調整」エリア入る際には白衣を脱ぐ、履物も専用のスリッパへ履き替えるなど、PCR試薬へのコンタミネーションを防ぐよう努めている。

また、上述の通り、PCRは鋳型DNAを100万倍以上に増幅する反応である。そのため、PCR反応を行う部屋 (増幅産物エリア) はそれ以前のエリアと区分けすることが必要である。PCR反応後の試料は他の作業エリアへ持ち込まずエリア内で廃棄するなど、増幅産物のコンタミネーションを避けることが求められる。

IV. 精度管理

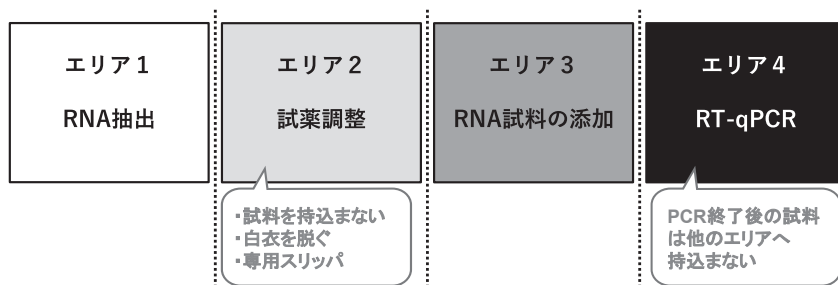
臨床検査の中でも、遺伝子検査はその結果が診断や感染の有無に直結する検査である。そのため、遺伝子検査には高い正確性が要求される。検査を実施する側は、精度管理を通して実施した検査工程の妥当性を示すことが重要である。

精度管理には、日々の検査の際に行う内部精度管理と、施設をまたいで行われる外部精度管理とがあるが、それぞれについて解説する。

1. 内部精度管理

内部精度管理で使用する管理試料には、陰性コントロール、陽性コントロール及び内部コントロールの3つがある (Table 2)。陰性コントロールは、検査試薬などにコンタミネーションがないことを示す目的で測定する試料である。これは、RNase Free Waterなど鋳型となるDNAやRNAを含まない試料で検査を行い、標的配列が検出されないことを確認するものである。陽性コントロールは標的配列を含んだ試料を用いて、標的配列が検出されることを確認するコントロール試料である。PCR試薬の調整に不備がなかったかなど、RT-qPCR (cDNA合成からPCR反応・検出まで) の工程に問題がない事を示す目的で測定する。このように、陰性コントロールと陽性コントロールは、実施したRT-qPCRが適切に実施されたかどうかを評価する指標となる。

次に内部コントロールであるが、これは検体毎にRT-qPCR反応が成立しているのかを確認するために実施する。例えば、検体中にPCR阻害物質が含まれている場合は、PCR反応が不十分となり陰性 (偽陰性) と判定される。このとき、内部コントロールを使用していれば、内部コントロールも増幅・検出がされず偽陰性に気づくことができ、誤報告を防ぐことが可能となる。陰性コントロール・陽性コントロール・内部コントロールの3つ全てが良好となって、初めて



- コンタミネーションの予防には「作業エリアの区分け」が有効
- ピペット類、試薬、手袋は各エリア専用のものとする(エリア間を行き来させない)

Fig. 3 遺伝子検査における作業エリアの区分け

Table 2 SARS-CoV-2遺伝子検査における精度管理試料

管理試料	使用例	備考
陰性コントロール	Rnase Free Waterなど	・ 標的配列が検出されないことを確認 ・ 検査試薬等にコンタミネーションがない事を確認
陽性コントロール	標的配列を含むRNA試料	・ 標的配列が検出されることを確認 ・ 実施した検査プロセスに問題がない事を確認
内部コントロール	標的配列と類似しないRNA試料 内在性遺伝子（ヒト細胞由来）	・ 試料毎における検査プロセスの評価 （PCR阻害物質の有無などの評価） ・ コントロールの種類によって評価できる検査プロセスが異なることに注意

Table 3 内部コントロールの例と評価可能な検査工程

	添加する タイミング	試料の種類	評価できる検査工程			
			検体の質	RNA抽出	逆転写反応	RT-qPCR
外因性	RT-qPCR	DNA				○
		RNA			○	○
	RNA抽出	RNA		○	○	○
内因性	（検体中のヒト遺伝子を使用）		○	○	○	○

「検査成立」と判断することができ、結果判定・報告をすることが可能となる。

2. 内部コントロールの種類

内部コントロールは検体毎の検査工程の評価の指標となると述べたが、内部コントロールはいくつか種類があり、その種類によって評価できる検査工程も異なる事を理解する必要がある（Table 3）。

内部コントロールは、外因性と内因性の大きく2つに分けられる。外因性とは検体試料に内部コントロールを添加するタイプであり、添加するタイミングにより評価できる検査工程が異なる。例えば、RT-qPCR時に添加する場合はRT-qPCRの工程について、RNA抽出時から添加する場合はRNA抽出と以降のRT-qPCRまでの工程を評価することが可能である。

一方、内因性とは検体試料中に一定量存在する遺伝子（ヒト細胞に由来するヒト遺伝子など）を使用するタイプである。この内因性は、鋳型となる試料を検体試料中に添加しない点が外因性と大きく異なる。例えば、Takara SARS-CoV-2

ダイレクトPCR検出キット（タカラバイオ社）⁵⁾では、ヒト遺伝子であるヒトリボヌクレアーゼP（ribonuclease P: RNase P）を内部コントロール（*キットの添付文書中には「内在性コントロール（internal control: IC）」と表記されているが、本稿では「内部コントロール」と表記する）としている。本キットの試薬中には、ヒトRNase P遺伝子に対するプライマーや検出プローブは含まれており、これは検体試料中のヒト細胞に存在するヒトRNase P遺伝子の増幅・検出を目的としている。不適切な検体保管により検体中の核酸（RNAやDNA）が壊れてしまっていた場合や、PCR反応が阻害された場合を仮定すると、新型コロナウイルスのウイルスRNAとともに、このヒトRNase P遺伝子（内部コントロール）も検出されないため、偽陰性判定を防止することが可能である。このように、内因性の内部コントロールを使用した場合は「検体採取が適切であったか」や「検査までの保管が適切であったか」など、検体の質についても評価することが可能である。

ここまで内部コントロールについての説明を

述べたが、自動分析機や測定試薬キットを用いて検査する際は、付属された（指定された）内部コントロールを使用することとなるため、自ら内部コントロールを選択して新たに検査の過程で追加する機会はほとんどないと思われる。しかしながら、正しい結果判定や結果の解釈、トラブルシューティングの際において、使用している内部コントロールの種類を正しく把握することは重要である。

3. 外部精度管理

外部精度管理は、多数の検査施設で同一の検体の検査を行い、その報告データを集計・解析することにより、各施設での検査が適切に行われているかを客観的に評価することができる。他の生化学検査らと同様に、遺伝子検査においても他施設との検査結果の相互確認する努力義務が規定されている⁶⁾。新型コロナウイルス遺伝子検査においては、当検査部ではこれまで「日臨技臨床検査精度管理調査（日本臨床検査技師会）」や「CAPサーベイ（College of American Pathologists: 米国病理医協会）」に参加し、いずれも良好な評価を修めている。外部精度管理で許容範囲から逸脱した際には、原因を追及し再発防止策を立てるなどの是正処置を行い、自施設の運用を見直し改善に努める必要がある。

V. まとめ

新型コロナウイルスの検査需要の増加に伴い、新型コロナウイルス遺伝子検査は急速に普及している。遺伝子検査は、精度管理による検査工程の妥当性を示すことが特に重要である

が、そのためには使用するコントロールの意義を正しく把握することが必要である。加えて、外部精度管理に積極的に参加するなど、自施設の検査が適切に実施されているか確認に努めることが重要である。

文献

- 1) 国立感染症研究所：2019-nCoV（新型コロナウイルス）感染を伴う患者の検体採取・輸送マニュアル ～2021/03/19更新版～。
- 2) キアゲン：QIAamp Viral RNA Miniプロトコールとトラブルシューティング。
- 3) 東洋紡：新型コロナウイルス検出キット-マルチ-(SARS-CoV-2 Detection Kit -Multi-) 添付文書（2022年5月6日改訂版）。
- 4) ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社：SARS コロナウイルス核酸キット インフルエンザウイルス核酸キット コバス@SARS-CoV-2 & Flu A/B 添付文書（2022年2月作成（第1版））。
- 5) タカラバイオ株式会社：SARSコロナウイルス核酸キット Takara SARS-CoV-2 ダイレクトPCR検出キット 添付文書（2022年10月改訂 第6版）。
- 6) 宮地勇人：「感染症検査の診療・検査・研究を担う次世代へのメッセージ」XII. 臨床検査の品質・精度を確保する医療法等改正とその意義. モダンメディア, 64: 81-87, 2018.

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし