

厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
 遺体における新型コロナウイルスの感染性に関する評価研究
 分担研究年度終了報告書

SARS-CoV-2 検出におけるスマートアンプ法の遺体への応用

研究分担者 永澤明佳 千葉大学大学院医学研究院附属法医学教育研究センター
 研究協力者 平田雄一郎 国立感染症研究所 感染病理部
 研究協力者 森 愛華 千葉大学大学院医学研究院法医学教室
 研究代表者 斉藤久子 千葉大学大学院医学研究院法医学教室

研究要旨

法医学解剖及び病理解剖において感染症の病原体検出は、死因究明の重要な項目の一つである。現在、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)は、世界では感染者数が爆発的に増加し、死亡者数も増加の一途をたどっている。日本での感染状況は、欧米諸国に比べれば、感染者数及び死亡者数ともに低いものではあるが COVID-19 の疑いのある遺体においては解剖前の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検出が、遺体の死因究明とともに、解剖従事者への感染防止の観点からも有用な情報となる。

臨床検体の場合、検査の種類としては、リアルタイム PCR 法、LAMP 法などの核酸検出検査、抗原検査及び抗体検査があるが、我々は、Smart Amplification Process (SmartAmp:スマートアンプ)法に着目した。このスマートアンプ法は、核酸増幅に基づく遺伝子診断技術であり、現時点では生体における臨床検体への実施のみであったため、我々は、遺体におけるスマートアンプ法を用いた SARS-CoV-2 迅速検出を試み、検体の種類やその採取方法等も含め、その検査方法の有用性について検討した。

2021 年 1 月から同年 5 月までに実施された 11 件の剖検またはネクロプシー(死後針生検)事例における鼻咽頭、口咽頭及び肛門からスワブサンプルを採取し、スマートアンプ法とリアルタイム PCR 法の結果を比較した。その結果、鼻咽頭及び口咽頭については、すべての事例で両方法とも同じ結果が得られたが、肛門スワブについては、リアルタイム PCR 法では陽性、スマートアンプ法では陰性となる 1 事例を経験した。スマートアンプ法はリアルタイム PCR 法よりも感度が低く、肛門スワブ液のようなウイルス量の少ない検体では結果が異なる可能性が考えられた。しかし、通常検査に用いられる鼻咽頭及び口咽頭の検体では、リアルタイム PCR 法と同じ結果が得られたことから、スマートアンプ法は遺体においても有用であることが示唆された。

A.研究目的

2021 年 1 月、Heinrich らは、COVID-19 感染遺体の鼻咽頭から採取した検体において、死後 35.8 時間でもウイルス増殖を示すサブゲノム RNA の検出及びウイルス培養が可能であったことを明らかにし、死後のご遺体からの感染の危険性を示唆した¹⁾。そのため死因が不明である遺体の解剖を行う際、その遺体の SARS-CoV-2 検出を行うことはより確実な死因究明を行うだけでなく、解剖に携わる全ての職種の感染リスク軽減のために重要な検査事項である。

現在、SARS-CoV-2 の検出は、感度の高いリアルタイム PCR 法が一般的であるが、RNA 抽出を行う労力と時間が必要であり、高価な機器を必要とし、操作が複雑であることなどから検査実施時間が約 2~4 時間ほどかかり、確定診断までには数時間を要する。一方、今回検討を行う核酸検出検査の一方法であるスマートアンプ法は、ウイルスに特徴的なプライマーと鎖置換活性を持つ DNA ポリメラーゼによって等温条件下でウイルスのゲノム核酸配列を増幅しウイルス遺伝子を検出するという方法である²⁾。株式会社ダナフォームと理化学研究所が開

発した「SmartAmp™ 2019 年新型コロナウイルス検出試薬」³⁾、核酸抽出試薬「Smart Extract」⁴⁾、専用機器である「LifeCase Smart」および「LifeCase Amp」を用いた場合、RNA 抽出時間は 8 検体で約 15 分程度であり、反応時間はウイルス量が多い場合は約 15 分、陰性の場合は約 40 分と短く、簡便で、特異性と感度が高いという利点がある⁵⁾。さらに、必要な機材全てが 2 つのアタッシュケースにコンパクトに格納されており、運搬が容易であり、解剖室、検視場所もしくは災害時の遺体安置所等での迅速検査が可能となる。

これまでのスマートアンプ法の有用性は、臨床検体を用いた報告と検査のみであり、死後検体を用いた報告はなく、ご遺体への有効性は現時点では不明である。

そこで、今回、我々はスマートアンプ法を用いた SARS-CoV-2 検査法が死後検体においても有用であるかどうかを、リアルタイム PCR 法の結果と比較し、検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. 対象検体

2021 年 1 月から 5 月までに実施された 11 件の剖検またはネクロプシー(死後針生検)事例における鼻咽頭、口咽頭及び肛門をぬぐったスワブサンプルを用い、スマートアンプ法とリアルタイム PCR 法の結果を比較した。

2. リアルタイム PCR 法の実施

RNA 抽出には、EZ1 Virus Mini kit もしくは EZ1 Advanced XL system (QIAGEN Inc., Hilden, Germany)、リアルタイム PCR 用試薬には TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 及び TaqMan™ 2019-nCoV Control Kit v1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、リアルタイム PCR 機器には、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を使用し、スワブサンプルにおける SARS-CoV-2 の有無を確認した。キットのプロトコルに従い、3 領域中 2 領域以上において増幅が確認された場合を陽性と判断した。

3. スマートアンプ法の検討

RNA 抽出は核酸抽出試薬「Smart Extract」に付属する吸引法を用いて抽出した。反応試薬

は、SmartAmp™ 2019 年新型コロナウイルス検出試薬(ダナフォーム、横浜、日本)を使用し、プロトコルに従い、反応液 1 検体あたり RNA 抽出液 10 µL、混合プライマー液 10 µL を混和し、合計 20 µL とし、反応時間は 40 分にて、SARS-CoV-2 の有無を確認した。陽性の判断は検出器が示す結果を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究については、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会により審査を行い、承認を得て実施している。

C. 研究結果

1. 各試料別結果

陽性検体 1 事例の肛門スワブにてスマートアンプ法(改良版簡易遠心法及び吸引法)とリアルタイム PCR 法とで異なる結果が得られた。

2. 事例判定結果

両方法において、3 試料中 1 試料以上で陽性と判断された場合、事例として陽性と判断した。その結果、両方法共に 11 事例中陽性 5 事例、陰性 6 事例で事例判定結果が一致した。

3. 死後経過時間の影響

死後経過時間は陽性事例で 2-11 日間程度、陰性事例で 3-5 日間であった。どの遺体も死後短い時間間隔で解剖が行われているため、高度腐敗等は確認されなかった。死後経過時間が 7-11 日間と推測される溺死体においても両方法での判定結果は一致した。

D. 考察

本研究にて、1 事例で、肛門スワブがリアルタイム PCR で陽性、スマートアンプで陰性と異なる結果になった。リアルタイム PCR では 10 コピー程度からでも検出が可能である一方、スマートアンプ法は人工合成ウイルスにて 50 コピーより検出可能であるとされている。肛門スワブにおけるウイルス量は少なく、そのため、リアルタイム PCR では増幅できたにも関わらず、スマートアンプでは検出できなかったと考えられる。しかし、死後経過時間が 7-11 日と推測された溺死体においても両方法で同じ陽性の結果が確認でき、鼻咽頭や口咽頭においてはすべて同じ結果が得られたことから、死後においてもウイルス量が保持されている部位から採取した検

体においてはスマートアンプ法が有用であることが示唆された。今後、ウイルス量が少ないご遺体でも同様の結果が得られるか検討する必要があると考えられる。

今回, SmartExtract 及び専用機器である Lifecase Smart を使用して抽出を行うことで抽出, 増幅併せて, 検査時間が約 1 時間短縮することが可能であった。さらに, 専用機器である SmartCaseAmp は, この増幅をモニタリングするための機材が一つのアタッシュケースにまとまっており, 容易に運搬でき, 様々な場所においてリアルタイムのモニタリング検査が可能になる。実際我々は他施設解剖室にて解剖前検査を行い, 結果を出すことができた。よって, 本法及びこれらの製品を用いることで, 場所, 時間を問わず検査が可能になる。すなわち解剖室や検視現場での検査が, さらには大規模災害発生時の遺体安置所における検査等も可能になり, 感染防止の観点からも有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究では死後検体におけるスマートアンプ法の有用性の検討を行い, 鼻咽頭及び口咽頭スワブではリアルタイム PCR 法と同じ結果が得られることから, 死後検体においてもスマートアンプ法が有用であることを明らかにした。新型コロナウイルス感染症が蔓延している現在において, 今後, 解剖現場だけでなく, 検視時や大規模災害時の遺体安置所など様々な場面において, スマートアンプ法を用いた検査が有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Heinrich F, Meißner K, Langenwalder F, Püschel K, Nörz D, Hoffmann A, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, Bibiza-Freiwald E, Pfefferle S, Heinemann A. Postmortem Stability of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Mucosa. *Emerg Infect Dis*. 2021 Jan;27(1):329-331.
- 2) 木村恭将, SmartAmp 法によるウイルス迅速検出, 臨床とウイルス, Vol.40, No.4, 215-221, 2012
- 3) 株式会社ダナフォーム「SmartAmp™ 2019 新型コロナウイルス検出試薬」
https://www.dnaform.jp/ja/products/snp_assa

y/smartamp_kit/, 最終アクセス日 2022 年 5 月 5 日

- 4) 株式会社ダナフォーム「Smart Extract」
<https://www.dnaform.jp/ja/about/news/>, 最終アクセス日 2022 年 5 月 5 日
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課及び国立感染症研究所「臨床検体を用いた評価結果が取得された 2019-nCoV 遺伝子検査方法について」2020 年 10 月 23 日版

F.健康危険情報

総括研究報告書参照。

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagasawa S, Mori A, Hirata Y, Motomura A, Ishii N, Okaba K, Horioka K, Makino Y, Nakajima N, Torimitsu S, Yamaguchi R, Inokuchi G, Chiba F, Hoshioka Y, Saito N, Yoshida M, Yajima D, Akitomi S, Iwase H, Saitoh H. SmartAmp method can rapidly detect SARS-CoV-2 in dead bodies. *Forensic Sci Int*. 2022. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.111168.

2. 学会発表

- 1) 森愛華ら, 遺体の新型コロナウイルス検出におけるスマートアンプ法の応用. 日本法歯科医学会第 15 回学術大会, 2021/7/31, 京都, 口演.
- 2) 森愛華ら, スマートアンプ法による遺体からの新型コロナウイルス検出. 第 90 回日本法医学会学術関東地方集会, 2021/10/9, 神奈川, 口演.
- 3) 永澤明佳ら, 遺体の SARS-CoV-2 ウイルス検出におけるスマートアンプ法の有用性. 第 27 回日本災害医学会, 2022/3/5, 広島, 口演.

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他