

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

COVID-19 関連死の遺体に残存する感染性ウイルスの調査

| | | |
|-------|-------|---------------------------|
| 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 | 森 愛華 | 千葉大学大学院医学研究院法医学教室 |
| 研究分担者 | 鈴木忠樹 | 国立感染症研究所 感染病理部 |
| 研究協力者 | 片野晴隆 | 国立感染症研究所 感染病理部 |
| 研究協力者 | 飯田 俊 | 国立感染症研究所 感染病理部 |
| 研究協力者 | 平田雄一郎 | 国立感染症研究所 感染病理部 |
| 研究分担者 | 槇野陽介 | 東京大学大学院医学系研究科法医学 |
| 研究協力者 | 中嶋 信 | 東京大学大学院医学系研究科法医学 |
| 研究協力者 | 坂井優子 | 東京大学医科学研究所感染免疫部門ウイルス感染分野 |
| 研究協力者 | 岩附研子 | 東京大学医科学研究所感染免疫部門ウイルス感染分野 |
| 研究分担者 | 河岡義裕 | 東京大学医科学研究所感染免疫部門ウイルス感染分野 |

研究要旨

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に感染した遺体もしくはその疑いのある遺体の解剖を行う際、その遺体に残存する新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のウイルス量や感染力の調査などを行うことは、より確実な死因究明のためだけではなく、解剖に関わる職種の感染リスク低減のためにも重要な検査事項である。

そこで、我々は、2021年1月から同年10月にかけて解剖を実施されたCOVID-19関連死の遺体11例において、鼻咽頭スワブ及び肺組織の計30検体において、ウイルス定量及びウイルス培養による感染力の調査を行った。その結果、11例中6例、30検体中13検体において、鼻咽頭粘膜及び肺組織に感染性ウイルスが存在し、感染力価の最高値は肺組織における 2.09×10^6 plate-forming units (PFU)/g、最低値は鼻咽頭スワブにおける 6.00×10^1 PFU/mLであった。本研究により、遺体に残存する感染性ウイルスの有無は、死亡日から発見日までの時間や遺体の置かれている環境に影響されることが示唆された。従って、COVID-19関連死の遺体の解剖においては、十分な感染防護体制のもとで実施されるべきであり、本研究では、「新型コロナウイルス感染症により亡くなられた方の解剖及びCT撮影に関する感染管理マニュアル」を提示した。また、遺体を取り扱う全職種の方々においても、感染症対策への教育、感染防護具の十分な供給などが必須であり、それらの取り組みは、今後の新たな感染症対策にも有用であることから、今後、早急に対応すべき喫緊の課題と考える。

A.研究目的

2021年1月、Heinrichらは、COVID-19遺体の鼻咽頭から採取した検体において、死後35.8時間でもウイルス複製を示すサブゲノムRNAが検出されたことを明らかにし、遺体からの感染の危険性を示唆した¹⁾。また、同年5月、Plenzigらは、COVID-

19遺体4名のスワブ10箇所及び左右肺を含む臓器11箇所において、2名の肺には感染性ウイルスが存在し、それぞれの死後経過時間は4日と17日であったことを報告した²⁾。しかし、この2例においてウイルスの分離は報告されたが、感染力価は報告されていない。また、死後4カ月で土中から掘り

起こされた木製棺内で納体袋に収容された COVID-19 遺体 2 例からは、SARS-CoV-2 が検出されたが、培養は陰性であったと報告された³⁾。

そこで、我々は、日本の法医学解剖もしくは病理解剖が実施された COVID-19 遺体 11 例の鼻咽頭粘膜及び肺組織におけるウイルス量、ウイルス培養による感染性ウイルスの有無及びその感染力を調査したので、ここに報告する。

B. 研究方法

1. 対象検体

2021 年 1 月から同年 10 月にかけて、日本国内で法医学解剖もしくは病理解剖が実施された COVID-19 関連死の遺体 11 例を対象事例とした。解剖前に鼻咽頭スワブを採取し、ウイルス輸送液 (SUGIYAMA-GEN Co., Ltd. Tokyo, Japan) に浸漬し、解剖中に肺組織の約 1~2 cm 角の組織片を採取し、いずれも解析までは -80°C に保管した。鼻咽頭スワブ及び肺組織の合計 30 検体を使用した。

2. RNA 抽出

鼻咽頭スワブのウイルス輸送液 200µL 及び肺組織約 20mg において、Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) を用いて、RNA 溶液 50µL を得た。

3. Real time reverse transcription(RT)-PCR によるウイルス定量

RNA 溶液 1µL を用いて、N1 領域及び N2 領域における Real time RT-PCR を実施した。プローブ及びプライマーの配列、反応条件は Adachi らの方法⁴⁾及び Shirato らの方法⁵⁾に準じており、内因性コントロールとして使用した hGAPDH-mRNA については、Katano らの方法に準じた⁶⁾。

4. ウイルス培養

細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所から入手したものを使用した。細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で、37°C、5% CO₂ で維持した。凍結組織をホモジナイズし、上清をウイルス分離と滴定に使用した。VeroE6/TMPRSS2 細胞培養単層を低混雑密度 (70~90% コンフルエント) で含む 24-well プレートを用意した。培地を捨てた後、100µL の原液または 10 倍希釈した試料を細胞に加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、5% FCS と抗生物質を含む DMEM 0.5 mL を加え、

37°C で 1 週間、細胞増殖効果が認められるまで培養した。

5. ウイルス力価測定

12 ウェルプレートにコンフルエントな Vero E6/TMPRSS2 細胞に、サンプルの原液または 10 倍希釈液 (10⁻¹~10⁻⁵) 100 µL を感染させた⁷⁾。37°C で 1 時間培養後、細胞を 1 回洗浄し、5% FCS 入り DMEM 中の 1% アガロース溶液で細胞を重層化した。プレートを 3 日間インキュベートした後、細胞を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。寒天を除去した後、プラークを数えた。

(バイオセーフティに関する声明)

SARS-CoV-2 ウイルスを用いたすべての実験は、農林水産省から認可された東京大学のバイオセーフティレベル 3 (BSL3) の実験室で行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、各研究機関の倫理審査委員会により審査を行い、承認後に実施した。

C. 研究結果

1. ウイルス培養結果

30 検体中 13 検体でウイルスが分離され、11 例中 6 例の鼻咽頭粘膜もしくは肺組織で感染性ウイルスが検出された。

2. 感染力価の測定結果

感染性ウイルスが検出された 13 検体のうち、感染力価の最高値は肺組織の 2.09E+06 plate-forming units (PFU)/g、最低値は鼻咽頭スワブの 6.00E+01 PFU/mL であった。また、最もウイルス量の少なかった検体は肺組織の 3,840copies/µL であり、その感染力価は 1.27E+04 PFU/g であった。

3. 遺体状況の検討

対象事例 11 例のうち、3 例は COVID-19 の治療を受けた入院患者であり、そのうち 2 例では感染性ウイルスは検出されなかった。肝硬変で入院後、院内感染し、重度肺炎で死亡した 1 例では、感染性ウイルスが検出された。

残りの 8 例のうち、ウイルスが分離された 5 例はいずれも死亡日から発見日までの期間が 0~1 日と短期間であった。1 例は、COVID-19 と診断されてホテル療養中の 10 日後に死亡している。また、死後 SARS-CoV-2 感染が確認され、冷蔵庫 (4°C) に安置されていた 2 例では、死後 12 日目でも感染

性ウイルスが検出された。

一方、死後3日以上室温で経過した3例においては、いずれも感染性ウイルスは検出されなかった。このうちの2例は高度に腐敗している状態であった。

D. 考察

本研究により、特定の条件下にある COVID-19 関連死の遺体には、感染力のある SARS-CoV-2 が肺組織または鼻咽頭に残存していることが明らかとなった。また、すでに、Sablonne らより報告されている⁸⁾が、本研究においても SARS-CoV-2 が低温に強いことが示された。また、対象事例の発見時期が日本の暑い夏の時期であったため、遺体の腐敗の進行が早く、死亡後に室内で3日以上経過している遺体では感染力はなかった。従って、遺体の感染力の有無は、遺体の置かれている状況に影響されることが示唆された。

SARS-CoV-2 感染後短期間で死亡した場合、COVID-19 の症状の悪化により死亡した場合、死後1日以内に遺体が発見された場合、また、発見までに遺体が低温環境にあった場合、遺体が長期間冷蔵庫に安置されていた場合などには、体内に感染性ウイルスが残存している可能性が高いと推測される。

2020年3月、タイでは、「forensic practitioner が感染したが、その当時、タイ国内では海外からの感染者のみで市中感染はなかったため、解剖の遺体から感染した可能性がある」と報告された⁹⁾が、同年5月に「解剖の遺体の検査を実施していないので、科学的な証拠はない」と訂正された¹⁰⁾。

日本国内では、2021年10月開催の第90回日本法医学会学術関東地方集会及び2022年6月開催の第106次日本法医学会学術全国集会で、横浜市立大学法医学教室より、COVID-19 遺体の一例において「鼻咽頭粘膜には少なくとも死後約9日間、感染性を有したウイルスが存在することが示された」という報告がされた。また、2022年5月の日本法歯科医学会第15回学術大会では、京都府立医科大学法医学教室より「検体採取及びPCR検査にあたった法歯学者が新型コロナウイルスに感染した死体から二次感染した可能性が考えられた一例」が発表された。

従って、COVID-19 関連死の遺体の解剖及び検査を実施する場合は、十分な感染防護体制のもとで行われるべきである。また、解剖従事者及び検

査者への感染症対策に関する教育及び訓練、感染症対策が施されている解剖施設であるかどうかの見直し、さらに、解剖及び検査を実施するために必要な感染防護具や防護服などの物資の提供などが重要であることが再認識された。

なお、本分担研究では鼻咽頭スワブ及び肺組織を対象としており、外表の拭い検体については検討していない。

E. 結論

COVID-19 に関連した遺体11例中6例では、感染性ウイルスが鼻咽頭粘膜または肺組織に残存していることが判明した。また、この感染性ウイルスの有無は、死亡日から発見日までの時間や、遺体の置かれている環境に影響されることが示された。従って、遺体を解剖や検査などで取り扱う際の感染防護対策は十分に実施すべきである。

謝辞

本研究にご協力いただきました、COVID-19 に関連し亡くなられました患者様、そのご家族及びご友人の皆様方に心より哀悼の意を表します。

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) Plenzig S, Bojkova D, Held H, Berger A, Holz F, Cinatl J, et al. Infectivity of deceased COVID-19 patients. *Int J Legal Med.* 2021;135:2055-60.
- 3) Plenzig S, Holz F, Bojkova D, Kettner M, Cinatl J, Verhoff MA, et al. Detection and infectivity of SARS-CoV-2 in exhumated corpses. *Int J Legal Med.* 2021;135:2531-6.
- 4) Adachi T, Chong JM, Nakajima N, Sano M, Yamazaki J, Miyamoto I, et al. Clinicopathologic and Immunohistochemical Findings from Autopsy of Patient with COVID-19, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:2157-61.
- 5) Shirato K, Nao N, Katano H, Takayama

- I, Saito S, Kato F, et al. Development of genetic diagnostic methods for detection for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. Jpn J Infect Dis. 2020;73:304-7.
- 6) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. J Med Virol. 2011;83:322-30.
- 7) Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 31;117(13):7001-7003.
- 8) Sablone S, Solarino B, Ferorelli D, Benevento M, Chironna M, Loconsole D, et al. Post-mortem persistence of SARS-CoV-2: a preliminary study. Forensic Sci Med Pathol. 2021;17:403-410.
- 9) Won Sriwijitalai and Viroj Wiwanitikit. 2020 May, COVID-19 in forensic medicine unit personnel; Observation from Thailand. Journal Forensic Legal Med Vol 72, May2020, 101964.
- 10) Won Sriwijitalai and Viroj Wiwanitikit. Corrigendum to “COVID-19 in forensic medicine unit personnel: Observation from Thailand” [J Forensic Legal Med 72 May 2020, 101964]. J Forensic Legal Med Vol 72, May2020, 101967.
- 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
なし
 2. 学会発表
なし
- 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
なし