新型コロナウイルス感染症対策
助成プログラム

研究報告書

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム
研究報告書の発刊にあたって

2020年から始まった新型コロナウイルスのパンデミックは、ワクチン接種の進展、治療薬の開発等で一部明るい兆しはあるものの、１年以上を経過した現在でも未だ収束は見えておりません。

このような状況のもと、「医工計測技術およびその関連分野」の発展に貢献することが弊財団の使命であることから、2020年6月に「緊急支援　新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」を創設し、45件の研究テーマに対して助成を行いました。

この度、その研究報告書を冊子にまとめましたので、ご一読いただけますと幸いです。

弊財団は、今後とも社会の要請に応えるべく、継続的かつ臨機応変な活動を進めてまいります。

最後になりましたが、ご研究いただいた研究者の皆様の今後ますますのご活躍を心より祈念いたします。

令和３年 10 月

公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団

中谷医工計測技術振興財団
新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム
研究報告書

目　　次

目次には申請時の題目及び所属を記載しており、各報告書のタイトルと異なる場合があります。

服部　浩一　順天堂大学大学院医学研究科ゲノム・再生医療センター　特任先任准教授
血管内皮障害による COVID-19 重症化の早期診断技術開発の基盤形成 ……1

鳥本　いづみ　横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター医学部放射線診断科　研究推進員
COVID-19 に対する放射線画像検査の有用性を予測 ……7

岡本　将輝　東京大学大学院医学系研究科公衆衛生学分野　特任研究員・日本学術振興会特別研究員
モビリティデータおよび気象データに基づく COVID-19 発症数予測モデルの構築 …… 11

北村　朗　北海道大学先端生命科学研究院細胞機能科学分野　講師
単一分子感度蛍光測定法を用いた新型コロナウイルス感染阻害剤スクリーニング法の確立…… 15

陳　中春　鳥取大学工学部機械物理系学科　教授
新型コロナウイルスに高い抗ウイルス活性を有する粉体素材の開発…… 21

藤原　幸一　名古屋大学大学院工学研究科　准教授
心拍変動解析に基づく COVID-19 重症化予測機械学習アルゴリズムの開発研究 …… 27

中野　道彦　九州大学大学院システム情報科学研究院電気システム工学部門　准教授
ハイスループット微粒子誘電泳動 DNA 検出法の開発 …… 31

永塚　健宏　大阪医科薬科大学研究支援センター　特務助教（助教）
新型コロナウイルス感染症診断の自動化システム確立のための基礎研究…… 35

佐久川　弘　広島大学大学院統合生命科学研究科生命環境総合科学プログラム　特任教授
新型コロナウイルスを一重項酸素を用いて不活性化する空気清浄・殺菌装置の開発…… 37

岩本　眞理　恩賜財団　済生会横浜市東部病院こどもセンター総合小児科　こどもセンター長
ファンフィルタユニットを用いた陰圧テントによる新型コロナウイルス感染防止策…… 41

合田　圭介　東京大学大学院理学系研究科化学専攻　教授
インテリジェント血小板凝集塊識別法を用いた新型コロナウイルス感染症の合併性血栓症の病態理解 … 45

松田　和之　信州大学医学部保健学科　教授
新型コロナウイルスに対する簡便・迅速な 磁気揺動核酸抽出装置・試薬キットの開発 …… 57

君嶋　葵　北里大学大村智記念研究所　微生物応用化学研究室　助教
蛍光ペプチドを用いた新型コロナウイルスの迅速検出方の確立…… 61

増田　直紀　ニューヨーク州立大学バッファロー校数学科数学科　准教授
接触ネットワークを用いた効率的な外出規制スケジュールの検討…… 63

竹中　繁織　九州工業大学大学院工学研究院物質工学研究系応用化学部門　教授
SARS-CoV-2 のパラレル 4 本鎖 RNA をターゲットとした 新型コロナウイルス検査法の開発 …… 65

荻野　景規　高知大学医学部医学科環境医学　特任教授
空間内エアロゾルに存在するウイルス粒子の高感度検出測定機器の開発…… 69

林　剛介　名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻　准教授
S タンパク質結合人工抗体を用いたコロナウィルス濃縮および抗原検査法の開発…… 71

村岡　貴博　東京農工大学工学部応用化学科　准教授
皮膚と接触する部分で使用可能なウイルス吸着，不活化材料の開発…… 73

小水内　俊介　北海道大学大学院情報科学研究院　助教
人工呼吸器の運用とそれに伴う様々な処置・ケアを包括的に扱える生体反応を呈示する
看護シミュレータの開発…… 77

春日井　大介　名古屋大学医学部附属病院救急科　病院助教
長期間の対外式人工心肺使用の安全性を改善する凝固管理手法の開発…… 81

野川　雅道　小松大学保健医療学部臨床工学科　准教授
敗血症早期発見・管理のための非侵襲中心静脈血中酸素飽和度計測システムの臨床評価…… 83

後藤　縁　名古屋大学医学部附属病院救急科　病院講師
COVID-19 のパンデミックに当たり、胸骨圧迫中の電動ファン付き呼吸用防護具（PAPR）の
保護効果を検討する…… 85

永井　慎　岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科　准教授
LAMP 法による増幅判別のための可視化薬の検討とその精度管理に関する研究 …… 89

杉田　典大　東北大学工学研究科技術社会システム専攻　准教授
非接触酸素飽和度測定を組み込んだ感染者スクリーニングシステムの開発…… 91

荒川　創一　三田市民病院神戸大学大学院医学研究科　兵庫県新型コロナウイルス感染症対策協議会　客員教授
新型コロナウイルス抗体検査による手術患者の術前スクリーニングに関する研究…… 97

森谷　浩史　大原綜合病院画像診断センター放射線科　副院長
非接触型呼吸機能検査の開発…… 101

長谷　哲成　名古屋大学医学部附属病院呼吸器内科　助教
気管支鏡検査時の飛沫感染防止シールドの開発…… 103

重藤　翔平　信州大学医学部附属病院臨床検査部　主任臨床検査技師
所要時間 30 分以下の迅速な新型コロナウイルス PCR 検査法の検討 …… 107

鄭　燦　国立循環器病研究センター研究所循環動態制御部　特任研究員
深部静脈血液還流促進による血栓症防止装置の開発…… 111

渡慶次　学　北海道大学大学院工学研究院応用化学部門　教授
SARS-CoV-2 および抗 SARS-CoV-2 抗体検出のための蛍光偏光イムノアッセイ …… 115

森島　賀子　浜松医科大学医学部総合人間科学講座化学　教務補佐員
附属病院を含む医科大学内の下水試料からの新型コロナウイルス簡易検出法の検討と
大学内疫学調査への応用について…… 121

河崎　秀陽　浜松医科大学医学部ナノスーツ開発研究部　部長・准教授
ナノスーツ法を用いた高感度多検体用イムノクロマトグラフィキットの開発
――新型コロナウイルス第二・第三波に備えて …… 123

安永　純一朗　熊本大学大学院生命科学研究部血液・膠原病・感染症内科　准教授
新型コロナウイルス SARS-CoV-2 に対する免疫応答と COVID-19 の病態における意義 …… 127

井上　雄介　旭川医科大学医学部先進医工学研究センター　講師
フレキシブルエレクトロニクスを用いたつけ爪型パルスオキシメータの開発…… 131

坂元　博昭　福井大学学術研究院工学系部門繊維先端工学講座ナノバイオ工学研究室　准教授
光架橋性核酸を修飾した磁気ビーズによる RNA 回収および画像判別技術の開発 …… 135

岡村　好子　広島大学大学院統合生命科学研究科生物工学プログラム　教授
不活化ウイルスの RNA 直接検出による感染検査の高速化 …… 141

西村　基　千葉大学医学部附属病院検査部　講師
nCoV の RNA 複製酵素を前処理に用いた、その検査の開発「敵の武器を逆利用」…… 147

森　康子　神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター臨床ウイルス学分野　教授
新型コロナウイルスに対する中和抗体誘導と肺炎重症化に関する研究…… 149

朴　　龍洙　静岡大学グリーン科学技術研究所グリーンケミストリー研究部門　教授
中空磁気蛍光ナノ粒子を用いた新型コロナウイルスの迅速・高精度デュアルモード検出法…… 151

前原　昭次　福山大学薬学部薬学科活性分子物理化学研究室　講師
含窒素有機化合物の分子モデリング法を用いた抗 COVID19 活性の評価…… 155

野村　保友　前橋工科大学工学部システム生体工学科　教授
コロナ重症者へのペリスタ式 ECMO 治療の効率化～有棘赤血球による圧閉度の最適化 …… 161

笹沼　直樹　兵庫医科大学病院リハビリテーション技術部　理学療法士
重症 COVID 症例における身体活動量の追跡調査による社会復帰予測式の構築 …… 165

程　久美子　東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻　准教授
コロナウイルスによる次のパンデミックを回避する siRNA 核酸の開発 …… 169

奥谷　智裕　東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻　染谷横田研究室　特任研究員
早期肺炎発見に向けた、装着型聴診器による呼吸音測定システムの構築…… 173

橋本　雅彦　同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻　教授
新型コロナウイルス検査における偽陰性判定の低減を目的とした小型デバイスの開発…… 177

血管内皮障害による COVID-19 重症化の早期診断技術開発の基盤形成

研究責任者　順天堂大学　大学院医学研究科
ゲノム・再生医療センター
特任先任准教授　　服部　浩一

１．はじめに

新型コロナウィルス感染症(COVID-19)の重症化に伴い、多臓器炎症症候群とも呼ばれるサイトカインストームを基礎とした疾患群、血栓傾向、川崎病類似血管炎、マクロファージ活性化症候群(MAS)の発生が次々と報告されている。本研究計画では、期間前半、可及的速やかに、研究責任者らが、これまでの研究で確立し、現在も使用中のウィルスベクターや薬剤投与、細胞輸注によって血栓性微小血管内皮障害、川崎病類似(型)血管炎、MAS 等、多臓器炎症疾患症候群の疾患動物モデルを使用し、疾患誘導後、経時的に末梢血を含む各種臓器・組織を採取する。次に血中の炎症性サイトカイン、アンジオクライン因子濃度、活性を測定し、臓器については病理切片を作製、アンジオクライン因子による免疫特殊染色、in situ hybridization による血管内皮を中心とした微小環境の細胞・組織構成を精査する。またソーティングによって採取した血管内皮細胞の包括的遺伝子発現を含む性状解析等を施行し、多臓器炎症症候群における血管内皮障害とサイトカインストームの発生や病勢との関係を明らかにすることを目標とした。期間後半、早急に準備が出来た段階で、研究協力者らを通じ、COVID-19 罹患患者情報として重症度や合併症、さらに各種薬剤投与を含む治療歴等、そして血中の凝固・線溶系因子等を含む内皮由来因子の検査、病理組織等を利用した内皮性状データを集積し、疾患モデルのデータとの照合、また国外の感染者の情報も参考にしながら、COVID-19 の重症化、多臓器炎症症候群発症の予見、早期診断に有用な因子を絞り込んでいくことを目指した。

２．内容

責任者らは、これまでの文科省・学振科研費での研究を通じて、血液凝固・線維素溶解系(線溶系)因子を含む血管内皮由来の生理活性物質—アンジオクライン因子分泌に伴う炎症性細胞動員と虚血性壊死組織の再生修復機構を解明した。また責任者らは、厚労科研での活動を通じ、アンジオクライン因子による生体恒常性維持機構の存在を示唆し、その破綻によるサイトカインストームを伴った MAS、川崎病類似血管炎、移植片対宿主病(GVHD)を含む炎症性疾患の病態制御機構を解明してきた[1) 2)]。

こうした研究成果を基礎として、責任者らは、血管内皮ストレス・障害の発生が、COVID-19 の重症化、あるいは多臓器炎症症候群発生の機序を担っているとの仮説(図 1.)に基づき、責任者らが使用中のサイトカインストーム関連疾患群の動物モデルと COVID-19 患者の検体を使用し、本研究では、COVID-19 重症化病態における血管内皮ストレス・障害の発生検出の意義、すなわち COVID-19 感染確認時、あるいは軽症時の検査でも、重症化の予見、早期診断が可能であ

ることを明らかにすることまでを長期目標に据えた。

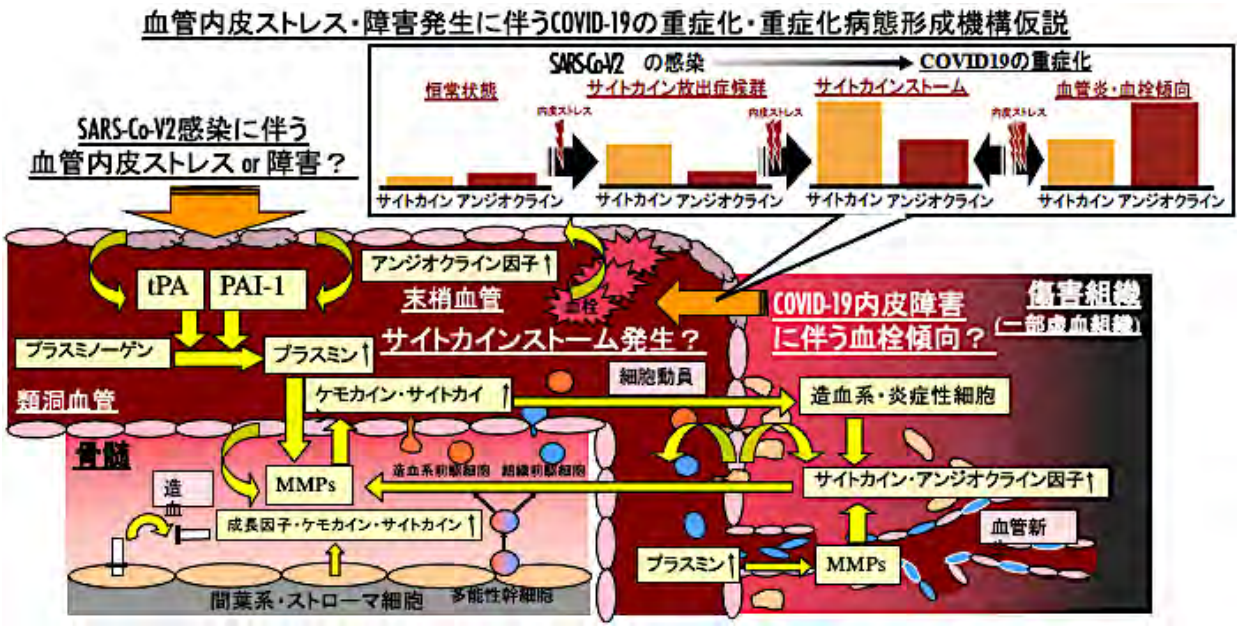
PCR や抗原検査等、COVID-19 の診断法は確立されつつある一方で、重症化の予見は依然困難であり、臨床上の最重要課題の一つとなっている。COVID-19 の重症化は、サイトカインストームや血栓傾向、MAS 様疾患の発生を招来し、欧米では、小児を中心に川崎病類似疾患の病態が問題化している。本研究の独創的な点は、これら COVID-19 の重症化病態の多くに、血管内皮障害が関与していることに注目した点であり、血管内皮障害の検出を通じた COVID-19 の重症化の早期診断法の確立、また血管内皮障害を端緒とした COVID-19 の重症化機構の包括的理解を国際的視野で目指した点が本研究の特色と言える。

3． 成果

炎症性サイトカインの代表である TNF-α を含む TNF ファミリーの構成因子の多くは、A disintegrin and metalloproteinase を含むメタロプロテアーゼによる細胞外ドメイン分泌を経て、血中に放出されている。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーは、膜型と可溶型(分泌型)とに大別されており、可溶型の多くは、前駆酵素(ProMMP)として放出され、これらが有するプロペプチドが、MMP 相互により限定分解除去されること(相互活性化システム)で、活性型、特に膜型 MMP のプロトタイプとされる MMP-14 は、アンジオクライン因子として血管内皮細胞から産生供給されることが判明しており、へと変換され、機能するのに対し、膜型は、活性型として細胞表層に発現し、機能する。MMP-2 を初めとする複数の MMP の活性化と細胞内外のシグナル伝達を通じ、炎症性サイトカインの産生と分泌のみならず、炎症性細胞群の動態を制御し、炎症性病変を構成する微小環境(ニッチ)の形成上、必須の因子であることが判明している。

責任者らは、サイトカインストームを伴う敗血症性ショック、そして急性 GVHD の疾患モデルの解析を通じて、MMP の活性阻害剤が、TNF-α や Fas ligand を含む炎症性サイトカインの血中濃度を抑制し、生存率と標的臓器の病理所見とを有意に改善することを報告した。 また MMP の相互活性化システムにおいては、セリンプロテアーゼに属する主要な線溶系因子、プラスミンが、MMP-13 や MMP-9 の活性化を上方から制御していることが知られている。プラスミンは、主に肝臓で産生される、その前駆酵素であるプラスミノーゲンが、やはりアンジオクライン因子である組織型プラスミノーゲンアクチベータ(tPA)により活性化されて生成する。筆者らは、デンマークのコペンハーゲン大学との共同研究で、主に血管内皮より産生供給される組織型 PA(tPA)のマウス生体への投与が、

図 1.



MMP-9 の活性化と内皮由来の造血因子分泌を通じ、造血幹細胞の炎症性細胞群への分化、そして動員を促進することを見出した。MMP の活性中心金属をキレートするタイプの MMP 阻害剤の多くに、欧米の固形癌に対する治験で深刻な副作用が認められたことから、これらの臨床応用は進んでいない。しかし、責任者らは、これらの実験結果から、抗線溶剤、つまり、プラスミンの生成阻害により、MMP の相互活性化システムを、かなり上方から制御出来ること、そしてこれに伴う炎症性サイトカインによる細胞外ドメイン分泌を有意に抑制出来ることを見出した。そこで、責任者のグループは、サイトカインストーム、またこの基礎疾患となる複数の炎症性疾患に対する抗線溶療法という新しい治療法開発の基盤形成に取り組んだのである。まず、敗血症性ショック、急性 GVHD に加え、MAS 等の各種炎症性疾患モデルを、MMP-9、あるいはプラスミノーゲン遺伝子欠損マウスとその野生型で作製したところ、興味深いことに、これらの遺伝子欠損マウスの生存率は、野生型と比較して有意に高いことが判明した。このため、責任者らは、神戸学院大学薬学部との共同研究で、プラスミンの活性中心に作用する新しいプラスミン阻害剤をドラッグリポジショニングの形で転用し、これらの疾患モデルとその対照群に投与したところ、疾患モデル群において、血中あるいは組織中のアンジオクライン因子である tPA 活性、プラスミン生成、そして MMP-2、MMP-9 の活性、発現と血中 TNF-α及び IL-6、 Fas ligand、 IL-1

図 2.

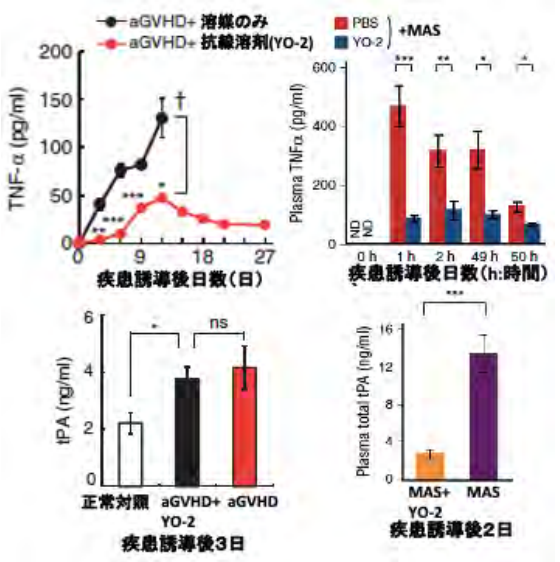
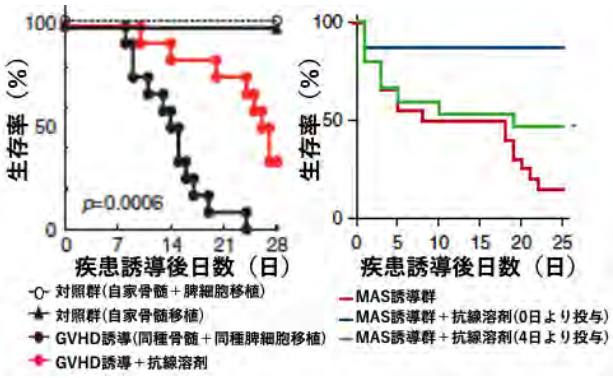


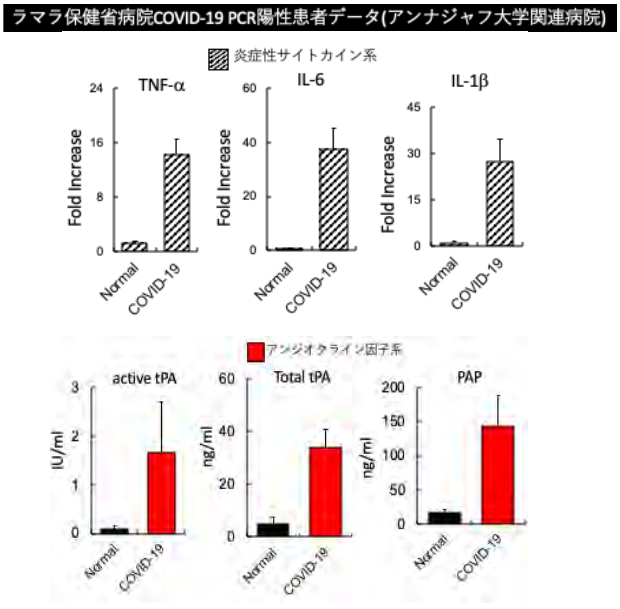
図 3.



β濃度を有意に抑制し(図 2.)、さらに生存率を改善することに成功した(図 3.)。

また、これら炎症性疾患モデルで、サイトカインストームが惹起されることを確認した[3)-5)]。また、この時、急性 GVHD 患者の炎症性サイトカインとアンジオクライン因子の血中濃度を測定したところ、次に来院時、有症状の中東・アジア、イスラエル・パレスチナに属するアンナジャフ大学で COVID-19 患者 20 人から採取した血液を採取し、精査したところ、マウス炎症性疾患モデルでも認められた血中の炎症性サイトカイン系の濃度増加に伴って、線溶系の賦活化因子でもある tPA、そしてプラスミン生成を示すプラスミン α2 アンチプラスミン複合体(PAP)濃度の増加が認められており、アンジオクライン因子系の活性増加が示唆されたことから炎症性疾患動物モデルで成立する仮説を裏付ける結果が得られた（図 4.)。

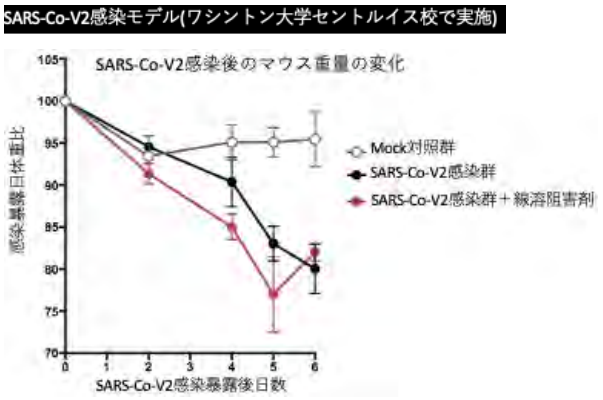
図 4.（未発表データ）



そこで責任者らは、各種炎症性疾患モデルで一定の成果を挙げたアンジオクライン因子系を何らかの薬剤により抑制することにより、炎症性サイトカインの産生・分泌を制御することを試みた。国内施設では、SARS-Co-V2 の感染実験は BSL3 の施設数が少ないこともあって短期間で予備実験を十分進めることが出来ないとの判断から、この分野で、近年目覚ましい研究成果を挙げている、ワシントン大学セントルイス校の Diamond S Michael 教授に、これまでの基礎研究データをご提示し、共同研究を申し出たところ、快諾して頂いた。

そこで、前述の抗線溶剤を SARS-Co-V2 の感染モデルに使用したところ、初回データとしては、対照群と比較して有意な予後の改善は認められなかった（図 5.）。

図 5.（未発表データ）



こうした実験結果の考察として、ワシントン大学の研究者とも話し合ったところ、臨床病態でも指摘されている通り、COVID-19 は、凝固系亢進、血栓形成の傾向が著しく、抗線溶剤による線溶系の阻害はむしろ凝固系亢進の傾向を助長する可能性があるため、このため、予後の改善が認められなかった可能性があることが推測された。実際、責任者らの所属施設を含めた国内の COVID-19 の治療においても、現在、ヘパリン、低分子ヘパリンなどの抗凝固剤の併用が、臨床的に普及し始めている。ただ、SARS-Co-V2 の細胞内侵入時にスパイク分解など、感染上重要な役割を担う Transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2)が、線溶系因子群と同様のセリンプロテアーゼ群に属していることから、抗線溶剤 YO-2 が感染初期段階より機能していればウィルスの侵入を阻害するなどの効果も期待されるため、SARS-Co-V2 の感染暴露よりも早いタイミングで投与する群を作製したところ予後の改善が認められたとの一報のあり、当方でも in vitro の状況で YO-2 の TMPRSS2 に対する活性制御状況を確認しているところである。

４．まとめ

疾患モデルと臨床検体の両面から COVID-19 の重症化を予見する因子として、血管内皮障害を示唆する一部のアンジオクライン因子 tPA、PAI-1、MMP などの血液中でのプロテアーゼ活性の増加、濃度増加が、サイトカインストームや血栓傾向等の COVID-19 の重症化病態の発生の前段階で認められることから、重症化の早期診断法開発において極めて有望であることが示唆された。臨床検体については、さらに現在進行中の本邦での集積を進め、早期診断上の有用性を確認し、確固たる基盤形成へと進めていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、海外研究者との連携を初め、終始献身的に動物実験、解析を責任者と共に進めた本学免疫診断学 Heissig Beate 特任准教授、また研究の初期から当方らの研究にご賛同、ご協力の上、共同研究として抗線溶剤 YO-2 をご提供頂いた、神戸学院大学津田裕子先生、岡田芳男先生にこの場を借りて感謝の意を表したく存じます。 また、本研究は、中谷医工計測技術振興財団助成金緊急支援新型コロナウィルス感染症対策助成プログラムから一方ならぬご支援を賜りました。改めて、ここに深謝致します。

参考文献および発表論文

1) Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, Salama Y, Eiamboonsert S, Ohta Y, Onoda H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H,

Heissig B and Hattori K. Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality and tissue damage in a murine model of macrophage activation syndrome. ***Blood.*** 130: 59-72, (2017)

2) Sato A,Nishida C,Sato-Kusubata K,Ishihara M,Tashiro Y,Gritli I,Shimazu H, Munakata S,Yagita H,Okumura K,Tsuda Y,Okada Y,Tojyo A,Nakauchi H, Takahashi S,Heissig B and Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. ***Leukemia.*** 29: 145-156, (2015)
3) Heissig B, Salama Y, Takahashi S, Okumura K and Hattori K. The multifaceted role of EGFL7 in cancer and drug resistance ***Cancers.*** in press (2021)
4) Heissig B, Salama Y, Takahashi S, Osada T Okumura K and Hattori K. The multifaceted role of plasminogen in cancer ***Int J Mol Sci.*** in press (2021)
5) Heissig B, Salama Y, Shimazu H, Takahashi S, Osada T and Hattori K. The multifaceted role of plasminogen in inflammation ***Cell Signal.*** 75:109761 (2020)

PCR 検査陰性症例の中で「偽陰性」の疑いが高い症例を
放射線画像検査と臨床情報を用いて検出する人工知能の実装および開発
-採択課題名：COVID-19 に対する放射線画像検査の有用性を予測-

研究責任者　横浜市立大学附属市民総合医療センター
放射線部
研究推進員　　鳥本　いづみ

１．はじめに

2019 年 12 月に中華人民共和国湖北省武漢市において新型コロナウイルス関連肺炎の発生が報告されて以降、世界各国・地域において新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が猛威を振るっている。2021 年 7 月現在、新型コロナウイルス感染症の重症度や死亡の関連要因など様々な研究報告が世界各国から報告されており、感染のリスクを踏まえながら病理解剖に臨んだ医師による診断報告もなされている。[1)]

しかし、COVID-19 に対する放射線画像検査の有用性は肺炎の有無・程度、その他臓器のスクリーニングに有用であるとの報告に留まり、COVID-19 に特異的な画像所見を得たとの報告はない。（心膜炎の診断に関する報告[2)]、肝炎に関する報告[3)]、腎炎に関する報告につき[4)]、など。）

一方、COVID-19 パンデミックにおける医療現場の社会的問題に着目すると、医療施設内におけるクラスター発生が病院機能の縮小および停止を余儀なくされ、その回復には 1-2 か月を要するといった重大な社会的損失を招いている。そこで、クラスター防止策に刮目し、画像検査の結果とその他検査（PCR 検査など）および患者情報をもとになされる主治医の診断（知能）を人工知能に実装させることによって、パンデミック時における遠隔医療の推進の一助となるのではないかと考え、画像検査の有用性の一環として人工知能の実装を試みた。

２．内容

2-1：画像所見に基づき肺炎所見を点数化

＜材料・方法＞済生会横浜市南部病院において COVID-19 感染症の確定診断がなされた（入院前 PCR 陽性症例）93 例、横浜市立大学附属病院にて COVID-19 陽性確定診断（重症患者）44 例、横浜市立大学附属市民総合医療センターにおいて COVID-19 陽性確定診断（重症患者）66 症例につき CO―RADS 分類[5)]を改変し、画像所見の点数化を試みた。GGO を認める胸部単純 CT 画像において COVID-19 性肺炎に認められる以下の 4 つの所見を点数化（両側性である場合 1 点、多発性である場合 1 点、(5 個以上の GGO)、下葉背側優位である場合 1 点、境界明瞭であれば 1 点、胸膜下の所見は異常ありなしを評価対象としない。）すべて指摘できる所見は総計 4 点＝Score5、一つも指摘できない所見は 0 点=　Score1 として点数を計算した。

Fig1　採点例（50 代男性）：両側性 GGO を認める（1 点）、多発性 GGO である（1 点）、下葉背側優位である（1 点）、下葉背側優位である（1 点）。合計 4 点として Score5 の症例である。

2-2：人工知能に実装した学習内容

済生会横浜市南部病院にて来院した 885 症例について上記採点法と臨床所見情報を点数化して COVID-19 チームによって採点し、①、合計点数が 5 点以上を偽陽性患者として治療方針を定め、②、入院 3 日目において総合評価点が基準値に満たさず PCR 陰性が確認されたのち隔離解除、基準値以上の症例は転科保留、さらに、③、入院 6 日以降に再度の総合評価を実施し PCR 陰性確認し隔離解除とした。COVID-19 非感染の最終診断はこれら PCR 検査がいずれも陰性である事と定義した。

入院時、PCR 陽性は平均年齢 58.1 歳、93 例（11.8%）に観察され、CT score は 1 が 5 例（5.2%）、score2 が 9 例（9.3%）、score3 が 15 例（15.5%）、score4 が 17 例（17.5%）、score5 が 51 例（52.5%）であった。PCR 陰性の症例は 792 例（89.2%）、CT score が score 1 が 132 例（18.2%）, score 2 が 345 例（47.5%）score 3 が 202 例（27.8%）, Score 4 が 44 例（6.0%）、score5 が 3 例（0.7%）であった。

また、上記画像診断点数化に関しては、肺 CT が score 4 以上を Covid-19 陽性と判定、感度 70.1%、特異度 93.5%,正診率 90.8%となった。入院 3 日での転棟保留は、172 例、20.9%に見られ CT score3、が 60.5%と優位に他の score より多かった。

2-3：AI に実装した学習内容

上記診断結果を以下のアルゴリズムにて AI に実装し、PCR 検査陰性症例の中で「偽陰性」の疑いが高い症例の検出を試みた。

2-3-1　材料

学習総数 885 例において偽陽性の疑いが高い症例を目的変数["false_negative"]として設定した。偽陽性の総数は 158 例である。

```
# 目的変数の個数
df["false_negative"].value_counts()
```

```
False    727
True     158
Name: false_negative, dtype: int64
```

次に、上記採点法による画像診断の点数評価の結果を「4 点以上を分類 1」,「3 点以下を分類 0」とする二値分類化し、[“CT over4”]に格納した。2-2 において実際に主治医等が用いた診断基準を二値の説明変数として格納した結果、14 個の説明変数を得た。

```
df.info()
```

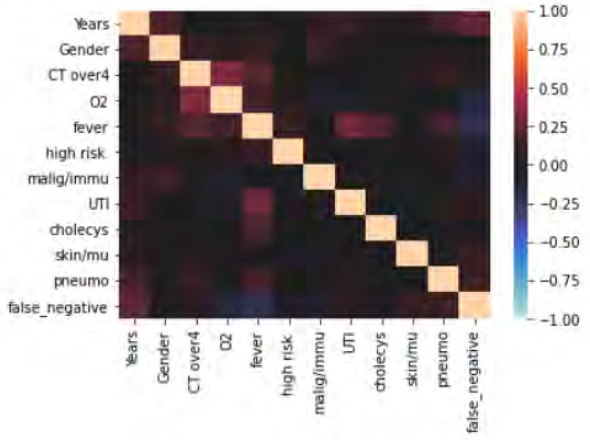
```
<class 'pandas.core.frame.DataFrame'>
RangeIndex: 885 entries, 0 to 884
Data columns (total 16 columns):
 #   Column          Non-Null Count  Dtype
---  ------          --------------  -----
 0   Years           885 non-null    float64
 1   Gender          885 non-null    float64
 2   CT Score        885 non-null    float64
 3   CT over4        885 non-null    float64
 4   Reevalu         885 non-null    float64
 5   PCR-            885 non-null    float64
 6   PCR-F/U         885 non-null    float64
 7   O2              885 non-null    float64
 8   fever           885 non-null    float64
 9   high risk       885 non-null    float64
 10  malig/immu      885 non-null    float64
 11  UTI             885 non-null    float64
 12  cholecys        885 non-null    float64
 13  skin/mu         885 non-null    float64
 14  pneumo          885 non-null    float64
 15  false_negative  885 non-null    bool
dtypes: bool(1), float64(15)
memory usage: 104.7 KB
```

次に、説明変数間における多重共線性を回避するため説明変数同士の相関係数を計算し、強い相関関係（0.8 以上）があるものを取り除いた。

（主成分解析による次元削減）。説明変数を 14 個→11 個とした。

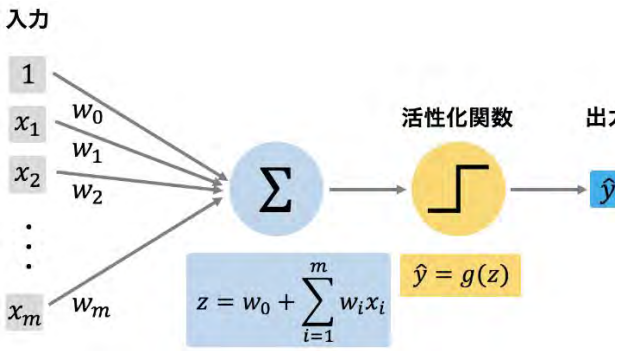
```
sns.heatmap(df_dropped_corr, vmax=1, vmin=-1, center=0)
```

```
<matplotlib.axes._subplots.AxesSubplot at 0x7f079841d0a0>
```



2-3-2　機械学習モデルのアルゴリズム

学習モデルは「パーセプトロン」を使用した。



https://axa.biopapyrus.jp/deep-learning/perceptron.html

パーセプトロンは、複数のシグナルを受け取り、1 つのシグナルを出力する。上記図のように入力データ x = (x1, x2, ..., xm) を受け取り、受け取った各特徴量に対してウェイト w = (w1, w2, ..., wm) をかけて合計を計算する。そして、その合計値に定数項 w0 を加えて（z = w0 + Σ wixi）、活性化関数に代入する。活性化関数は z を受け取り、z > θ ならば 1 を出力し、そうでなければ 0 を出力する。学習データのセットのすべてのデータを使ってこの更新を行い、すべてのデータに対して正しい判断がなされるようになるまで自動で繰り返される。よって、出力の正誤による重みの値（まとめて wi と表す）についても機械学習を通して自動的に変化させることが可能である。

以下、データをセットし、ホールドアウト法にて学習データと訓練データを 7 : 3 に分割し、学習を実行した。

```
# 形状を確認
print("Y=", Y.shape, ", X=", X.shape)
```

```
Y= (885,) , X= (885, 11)
```

```
# データの分割（ホールドアウト法）
X_train, X_test, Y_train, Y_test = train_test_split(X, Y, test_size=0.3, random_state=0)
X_train, X_valid, Y_train, Y_valid = train_test_split(X_train, Y_train, test_size=0.3, random_state=0)
```

```
# 形状を確認
print("Y_train=", Y_train.shape, ", X_train=", X_train.shape)
print("Y_valid=", Y_valid.shape, ", X_valid=", X_valid.shape)
print("Y_test=", Y_test.shape, ", X_test=", X_test.shape)
```

```
Y_train= (433,) , X_train= (433, 11)
Y_valid= (186,) , X_valid= (186, 11)
Y_test= (266,) , X_test= (266, 11)
```

活性化関数は入力層・隠れ層に relu 関数、出力に Sigmoid 関数を設定。

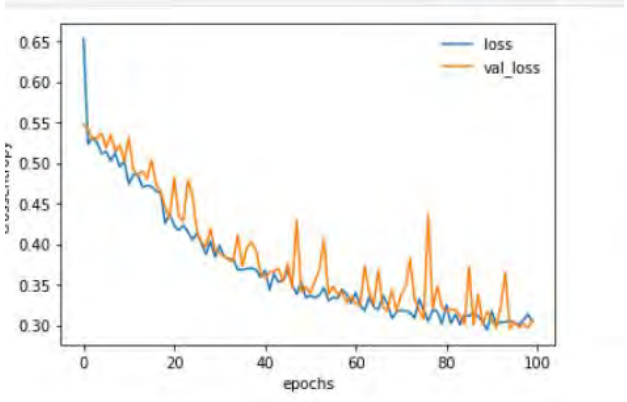
```
# モデルの初期化
model = keras.Sequential()

# 入力層
model.add(Dense(11, activation='relu', input_shape=(11,)))
# 隠れ層
model.add(Dense(8, activation='relu'))
# 出力層
model.add(Dense(1, activation='sigmoid'))

# モデルの構築
model.compile(optimizer = "rmsprop", loss='binary_crossentropy', metrics=['accuracy'])
```

```
# モデルの構造を表示
model.summary()
```

```
Model: "sequential"
_________________________________________________________________
Layer (type)                 Output Shape              Param #
=================================================================
dense (Dense)                (None, 11)                132
_________________________________________________________________
dense_1 (Dense)              (None, 8)                 96
_________________________________________________________________
dense_2 (Dense)              (None, 1)                 9
=================================================================
Total params: 237
Trainable params: 237
Non-trainable params: 0
_________________________________________________________________
```

```
%%time
# 学習の実施
log = model.fit(X_train, Y_train, epochs=100, batch_size=32, verbose=True,
                callbacks=[keras.callbacks.EarlyStopping(monitor='val_loss',
                                                         min_delta=0, patience=100,
                                                         verbose=1)],
          validation_data=(X_valid, Y_valid))
```

以下の学習結果を得られた。



3．成果

テストデータによる評価とテストデータによる汎化性能を評価し、精度 80%（Accuracy と f1-score の交点：0.80）、感度 87%（recall-

True：0.87）の人工知能を実装した。

```
# predictで予測を行う
Y_pred = model.predict(X_test)

# 二値分類は予測結果の確率が0.2以下なら0,
# それより大きければ1となる計算で求める
Y_pred_cls = (Y_pred > 0.2).astype("int32")
```

	precision	recall	f1-score	support
False	0.97	0.79	0.87	219
True	0.47	0.87	0.61	47
accuracy			0.80	266
macro avg	0.72	0.83	0.74	266
weighted avg	0.88	0.80	0.82	266

4．まとめ

COVID-19 における放射線画像診断においては、炎症を起因とする全身状態の把握に留まり、画像診断のみをもって COVID-19 の診断をすることは不可能であった。今回の研究において COVID-19 に対して高い特異性はない画像検査と、同じく精度が 70%程度と報告されている今回の研究では、画像診断と PCR 検査と患者情報に基づき偽陰性を抽出する精度が 80%の人工知能が完成したが、このような主治医の知能を実装した人工知能は遠隔医療、DX（下剤）デジタルトランスフォーメーション）の実現の一助となり得ると考えられた。

謝辞

研究協力者としてデータを提供して頂いた横浜市立大学附属病院、済生会横浜市南部病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター各 COVID-19 チームの皆さまに、心より御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1) Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2： N Engl J Med. 2020 Aug 6;383(6):590-592.
2) Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Valentina O. Puntmann, MD, PhD et.al
3) 肝機能障害発症を報告した論文 Association of coagulopathy with liver dysfunction in patients with COVID 19：Hepatol Res：Takeya Tsutsumi et.al.
4) Renal Manifestations of Covid-19: Physiology and Pathophysiology Zaher Armaly et.al；Review J Clin Med . 2021 Mar 15;10(6):1216.
5) Mathias Prokop et.al CO-RADS: A Categorical CT Assessment Scheme for Patients Suspected of Having. 2021Feb;51(2):227-232.

モビリティデータおよび気象データに基づく COVID-19 発症数予測モデルの構築

研究責任者　東京大学大学院医学系研究科
公衆衛生学分野
特任研究員　　岡本　将輝

１．はじめに

2019 年末に世界で初めて報告された新型コナウイルス感染症は深刻な拡大を続け、翌 2020 年の 3 月には世界保健機関（WHO）が「パンデミック」を宣言した。歴史上にも稀有な公衆衛生学上の危機となった本感染症は、同年 6 月段階で世界 188 カ国において 1000 万人の新規発症、50 万人の死亡を認め、その後も事態は増悪を続けた[1]。

この未曾有の感染症への対策は世界各国喫緊の課題となり、新薬開発とドラッグリポジショニングは多面的に進められたが[2)-4)]成果は限定的であり、2021 年現在で未だ有効な治療薬は得られていない。現在は新規ワクチンによる発症予防効果に大きな注目が集まり、予防戦略における柱の一つとして各国政府主導により大規模な接種勧奨が進められている。

そういったなか、ロックダウンを含めた移動制限による感染拡大予防策を各国は感染拡大初期から実施し、一定の予防効果が報告されている[5),6)]。しかし我が国において、新型コロナウイルス感染症の感染拡大予防の観点からは、どの種の移動制限をどれだけの期間継続する必要があるかについて、科学的根拠に基づき仔細に分析した報告は限られている。したがって今回我々は、人の動きに関するデータベース（モビリティデータ）と気象データベース、感染症データベースを利用し、新型コロナウイルス感染症の発症者数を予測する機械学習モデルを構築することを研究の目的とした。

２．内容

本研究では、モビリティデータとして Google 社が提供する「COVID-19 Community Mobility Reports」[7)]を活用した。これは同社の位置情報プラットフォームである Google MAP によって収集された匿名化・集約データで、感染症対策への一助として無償公開されている。データは各カテゴリ（Retail & recreation、Grocery & pharmacy、Parks、Transit stations、Workplaces、Residential）で定義付けられた場所への訪問者数が曜日別基準値と比べてどう変化したか（増減率）を示す。なお、各曜日別基準値は 2020 年 1 月 3 日～2 月 6 日の 5 週間に渡る曜日別中央値が採用されている。本研究においては 2020 年 2 月 15 日～2021 年 6 月 30 日までの東京におけるモビリティデータを利用した。

また、日毎の新規発症者数については、東京都が提供する「新型コロナウイルス感染症発症日別による陽性者数の推移」[8)]を用いた。また、感染拡大を規定するもう一つの仮説的因子としての気象条件は、日毎の平均気温(℃)、降水量の合計(mm)、日照時間(時間)、平均気圧(hPa)、平均湿度(%)、平均風速(m/s)について、気象庁が提供する公開データから収集を行った[9)]。

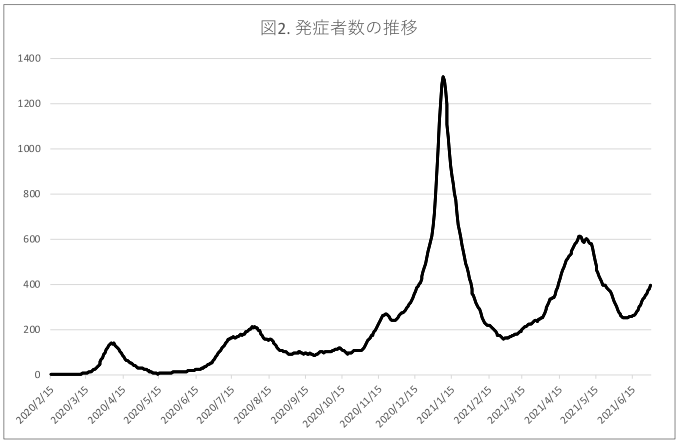
これらの時系列情報としてのモビリティデー

タおよび気象データから、日毎の新規発症者数を予測する複数の数理モデル（最小二乗法による線形回帰モデル、Recurrent Neural Network および Multilayer Long Short-Term Memory）を構築した。2 種のニューラルネットワークは汎化性能向上と過学習防止のため、ハイパーパラメータチューニングを行った。データセットは 3 種類に分割しており、モデルの精度評価のためのテストデータは直近 20%を、残り 80%のうち 60%をトレーニングデータに、20%をバリデーションデータに割り当てた。ハイパーパラメータの検証にはランダムサーチを用いた。

3．成果

図 1 は、公共交通機関における日毎のモビリティ増減率の 7 日間単純移動平均値の推移を示す。

対象期間中、一貫して曜日別基準値を下回り、複数回に渡る緊急事態宣言等の移動自粛要請に応じた変動を認める。また、図 2 は日毎の発症者数における 7 日間単純移動平均値の推移を示す。感染拡大の第 1 波～第 4 波が視覚的に明示されている。



新規発症者数を予測する独立変数のうち、アウトカムに対して最も高い説明力を示したのは公共交通機関におけるモビリティ増減率で、東京都における新規発症者数変化の 47.03%を説明した。気象データは全項目で 4.20%であった。全ての独立変数を用い、最も優れた予測精度を示したのは Multilayer Long Short-Term Memory で、7 日後の新規発症者数に対して 67%となった。

モビリティデータと気象データの深層学習によって、新規発症者数を妥当に予測し得ることを示した。一方、精度の限界については、テストデータの対象期間に変異株の出現とワクチン接種の開始が含まれていることが影響していると考えられ、追跡期間の延長と状況の定常化によってより安定した予測を実現する可能性がある。

なお、本研究成果は論文投稿中であり、解析および結果の仔細についての記述は省略している。

4．まとめ

モビリティデータおよび気象データに基づく COVID-19 発症数予測モデルの構築を行った。今後、モデル精度向上のための入力情報拡充とともに、他地域および他国への適用を通し、地域特異的でより現実的な感染症予防への施策立案に資するエビデンス提供を続けていきたい。

謝辞

本研究計画の遂行にあたり、協力頂いた教室スタッフおよび関係各位に感謝申し上げます。本研究計画は中谷医工計測技術振興財団「新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」による研究助成を受けて実施しました。

参考文献および発表論文

1) WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and

Weekly Operational Update. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports

2) M Wang, R Cao, L Zhang, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. Cell Res. 2020; 30: 2-71.
3) J Liu, R Cao, M Xu, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. Cell Discov. 2020; 6: 16.
4) Y Wang, D Zhang, G Du, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet. 2020; 395: 1569-78.
5) D Delen, E Eryarsoy, B Davazdahemami. No Place Like Home: Cross-National Data Analysis of the Efficacy of Social Distancing During the COVID-19 Pandemic. JMIR Public Health Surveill. 2020; 6: e19862.
6) 5.Andersen M. Early Evidence on Social Distancing in Response to COVID-19 in the United States. SSRN. 2020; 6: 1-11.
7) Google. COVID-19 Community Mobility Reports. https://www.google.com/covid19/mobility/
8) 東京都福祉保健局. 「新型コロナウイルス感染症発症日別による陽性者数の推移」 https://catalog.data.metro.tokyo.lg.jp/dataset/t000010d0000000093/resource/55bc482a-9732-450a-95f2-778b8577de70
9) 気象庁. 「過去の気象データ」 https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/

単一分子感度蛍光測定法を用いた新型コロナウイルス感染阻害剤スクリーニング法の確立

研究責任者　北海道大学　先端生命科学研究院
細胞機能科学分野
講　師　　北村　朗

１．はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は，中国・武漢で 2019 年末に報告された重症急性呼吸器症候群 (SARS) の原因ウイルスであり，この感染症は COVID-19 と呼ばれる．2020 年初頭から中国のみならず全世界に感染が拡大し，経済活動のみならず，流通，教育，研究活動など多くの社会活動が制限される事態となっている．

SARS は元々，2002 年に中国南部の広東省で非定型性肺炎の患者が報告されたものに端を発しているが 1)，この時の原因ウイルスはコロナウイルスの一種であり, SARS-CoV と命名された. 2019 年の SARS-CoV-2 は，ゲノム配列の相同性解析からその近縁ウイルスとされている 2)．実際，様々な類似性を有することが知られており，感染機構として，ウイルスが結合するヒト細胞表面の受容体として，SARS-CoV と同じ 2 型アンジオテンシン変換酵素 (ACE2)が速やかに同定された．ACE2 は主要な SARS-CoV および SARS-CoV-2 の細胞表面受容体であると考えられており，ウイルスの表面にあるスパイクタンパク質 (S タンパク質) と呼ばれる突起状タンパク質の一部の領域が ACE2 と結合することで，ウイルスの細胞表面結合時間が長くなる．次に，同じく細胞膜に存在するプロテアーゼ TMPRSS2 により，S タンパク質が切断され活性型となり，感染が成立する（図 1 ）3)．また，SARS-CoV の S1 と比べて，SARS-CoV-2 の S1 (S1-2) は，ACE2 との相互作用が強くなることが報告されている 4).

S タンパク質は大きく二つのドメインから成り

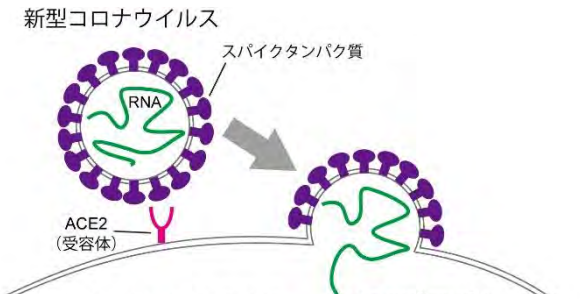


図１　新型コロナウイルスの感染機構

立っており，S1，S2 とそれぞれ呼ばれている．S1 は S タンパク質の先端部分のドメインであり，ACE2 と結合するレセプター結合ドメイン (RBD) を含む. S2 は S タンパク質の支柱のような構造をする部分である．このようなウイルス感染時に起こる反応であるレセプターとウイルスの結合を阻害することができれば，感染阻止または感染予防薬としての利用価値が高い. また, COVID-19 では，肺や呼吸器に感染し増殖したウイルスが同じ個体内の血管内皮細胞への感染を経て，その他の臓器などへ広がり，多臓器障害を起こして重症化をもたらす可能性も指摘されていることから 5)，そのような感染の広がりを防ぐこともできる可能性がある．ワクチンにより免疫がつくられたとしても, その予防効果は 100%ではなく, 発症後に治療できる薬剤の探索は依然，極めて重要な課題である．重症化した患者への治療として，中和抗体や一部の副作用が強いと言われる薬剤の投与

が行われているが，前者は生産や保管に一定の制約があり，また後者の例を含めても，重症者への投与に限定されており，処方箋などにより家庭で簡便に COVID-19 を予防または治療できる薬剤の同定は緊急的課題である．

現状，COVID-19 予防または治療薬の選定・開発は全世界的に急務な課題ではあるが，新規化合物を探索している時間的余裕はないことから，転用可能な既存薬や化合物を探索するのが現実的と考えられており，ACE2 と S1 の相互作用を阻害できる薬剤を簡便にスクリーニングできる技術の確立は急務である．そこで本課題では，二色の蛍光分子間の相互作用を単一分子感度で検出できる蛍光相互相関分光法 (FCCS) 6] を用いて，ACE2 と S1 タンパク質の相互作用を検出できる計測法を確立することを目的とした（図２）．

図２　蛍光相互相関分光法（FCCS)による ACE2-スパイクタンパク質間相互作用計測系の概要

FCCS は，二種の蛍光分子が共焦点光学系で作り出した検出領域（共焦点領域とも呼ばれる）を通過する際に生じる蛍光強度ゆらぎの同時性を，相互相関関数解析することにより，相互作用強度を求めることができる手法である．

２．内容

蛍光標識された ACE2 および S1 タンパク質を実験室で準備する上で，いくつかの方法を検討した．まず，市販されたリコンビナントタンパク質を購入する方法を考えたが，これは販売価格が高価であることから継続的利用に向かないと判断した．また，FCCS 測定を行うためにはそれらのタンパク質に有機蛍光色素等を反応させることから，結合領域を阻害してしまう可能性を考えた．そこで，蛍光タンパク質でタグ付けしたタンパク質を哺乳類細胞で発現させ，そこから抽出したタンパク質を準備し，FCCS を用いて相互作用解析を行うことにした．

３．成果

最初に，単量体改変型緑色蛍光タンパク質 (meGFP)で標識した ACE2（G-ACE2; 膜貫通領域は欠損させたもの）および，単量体型赤色蛍光タンパク質 mCherry で標識した，SARS-CoV 由来の S1 タンパク質 (S1) または SARS-CoV-2 由来の S1 タンパク質 (S1-2) を小胞体 (ER) に発現させるプラスミドベクターを構築した．これらのプラスミド DNA をマウス神経芽細胞種 Neuro2a 細胞に一過的に発現させ蛍光顕微鏡観察を行ったところ，小胞体に発現が確認できた．しかしながら，細胞破砕液を得てその中の存在量を確かめたところ，濃度が極めて薄く，そのままでの濃度では継続的な相互作用解析には適さないことが分かった．そこで，アフィニティ精製により，目的タンパク質の濃度を上げることを試みた．Neuro2a

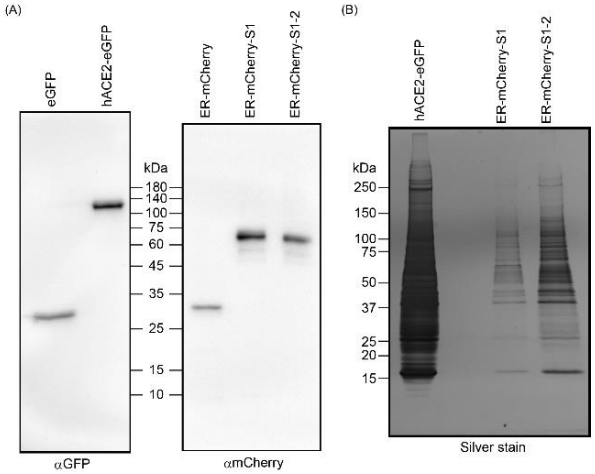


図３　抗 GFP 抗体または抗 mCherry 抗体を用いたウェスタンブロット（A）及び銀染色（B）による精製タンパク質の確認.

の培養細胞数を増やすために，15 cm ディッシュ 10 枚での培養を試み，さらに遺伝子導入試薬のランニングコストを下げるため，ポリエチレンイミ

ン (PEI)を導入試薬として用いた．細胞破砕液から His タグを用いて Ni-NTA アガロースビーズでアフィニティ精製を行ったところ，高純度の精製標品は得られなかったが，全長タンパク質は得られておりまた分解産物などは確認できなかった（図３）．また，継続的な相互作用解析は行える程度の濃度のタンパク質溶液を濃縮させて得ることができた．そこで，このようにして用意したタンパク質溶液を混合し，FCCS にて相互作用解析を行った．

その結果，まずコントロールとして，G -ACE2 と mCherry 単量体では，正の振幅を持つ相互相関関数は得られなかったのに対し，S1 または S1-2 と G-ACE2 を混合すると，正の振幅を持つ相互相関関数が得られた（図４A）．また，S1-2 と G-ACE2 を混ぜたときの相互相関関数の振幅は，S1 を用いた時よりも高かった（図４A）．次に，より定量的に相互作用強度を求めるために，相関関数に対し非線形カーブフィッティングを行うことで，相互相関関数または自己相関関数の振幅から，分子数を求め，相互作用している分子数を緑色の分子数で割った値 (Relative cross-correlation amplitude:

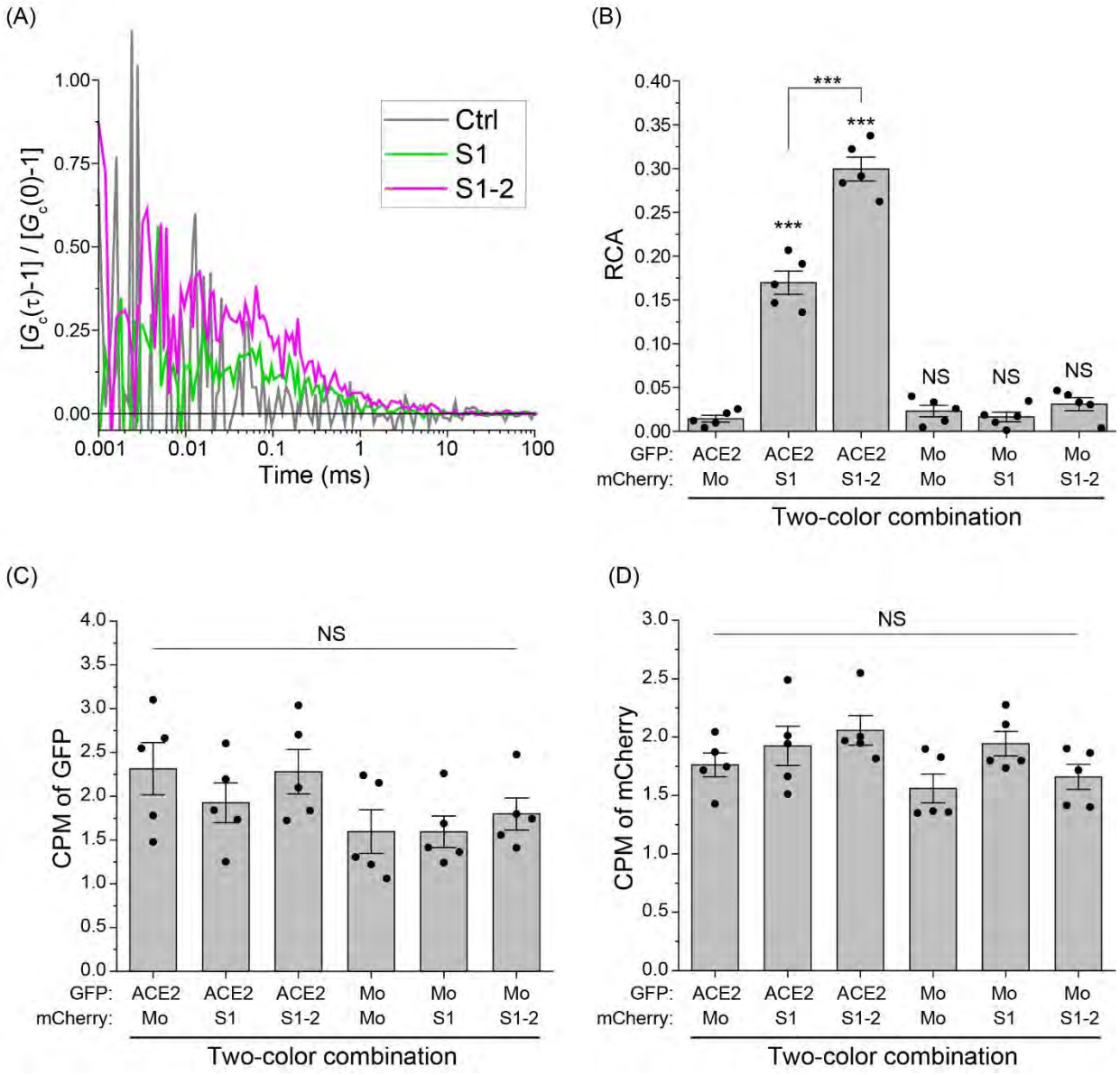


図４　FCCS を用いた G-ACE2 と S タンパク質の解析結果．(A) 規格化相互相関関数　(B) Relative cross-correlation amplitude (RCA) (C) GFP の一分子輝度　(D) mCherry の一分子輝度．Bars = mean ± SE (n = 5); ***p < 0.05; NS: not significant.

RCA と呼ばれる)を用いて，相互作用強度を比較した．コントロールでは正の RCA 値は得られなかったのに対し, G-ACE2 と S1 または G-ACE2 と S1-2 を混合した時に，正の RCA 値が得られ，かつ S1-2 の時に，S1 よりも高い値を示した（図５B）．これまでも報告があるように，受容体である ACE2 と S タンパク質の相互作用は，SARS-CoV-2 で強いことを FCCS でも確かめることができた．さらに，FCS では計測された平均蛍光強度を計測分子数で割った値（Counts per molecule; CPM）を求めることができる．これは一分子当たりの蛍光強度または輝度として表現されることから，分子のホモ多量体化の有無を解析できる．その結果, ACE2, S1, S1-2 すべて，単量体の蛍光タンパク質と変わらない CPM であったことから，これらのタンパク質は単量体として存在し，1:1 の結合比で相互作用していることが示唆された（図５, C & D）．

以上のことから，ACE-S タンパク質間相互作用の計測に FCCS が利用できることを実証できた．

４．まとめ

マウス神経芽細胞種 Neuro2a に蛍光タンパク質で標識した目的タンパク質を発現させ，溶解・精製後，FCCS を用いることで，ウイルススパイクタンパク質の受容体結合ドメインとヒト細胞側主要受容体である ACE2 間の相互作用を検出できる計測系を確立できた．今回の FCCS では，使用する液量が一測定に 10 マイクロリットル程度，濃度は 10 nM での測定で測定ができており，これは試料の量を抑制してスループットを上げる上で大きな利点となる計測条件であると考える．

また，COVID-19 の治療薬候補として，その医療的・社会的に急務な要求性から，既存薬の転用が試みられているが 7)，FCCS は上記の条件によりそのような要求性を満たす計測手法であると思われる．また，スパイクタンパク質を認識する中和抗体が患者の中で産生されることが知られているが 8)，この中和抗体の特性・効力を解析するための計測手法としても有用性があると考えられる．本助成金で行われた本成果は，現在原著論文として投稿準備中である．

謝辞

タンパク質発現系の初期検討を行ってくれた北海道大学生命科学院修士課程学生の呂さん，そしてタンパク質精製と FCCS 測定に協力してくれた同修士課程学生の藤本さん，そして，研究・実験環境を与えて頂きました北海道大学　先端生命科学研究院　金城政孝教授，以上三名の共同研究者の方々には，この場を借りて感謝申し上げます．

参考文献および発表論文

1) Ksiazek, T.G., et al., *A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome*. ***N Engl J Med***, 2003. **348**(20): p. 1953-66.
2) Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V., *The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2*. ***Nat Microbiol***, 2020. **5**(4): p. 536-544.
3) Zhao, P., et al., *Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor.* ***Cell Host Microbe***, 2020. **28**(4): p. 586-601 e6.
4) Lan, J., et al., *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.* ***Nature***, 2020. **581**(7807): p. 215-220.
5) Monteil, V., et al., *Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2*. ***Cell***, 2020. **181**(4): p. 905-913 e7.
6) Kitamura, A., K. Nagata, and M. Kinjo, *Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques*. ***Int J Mol Sci***, 2015. **16**(3): p. 6076-92.

7) Jang, W.D., et al., *Drugs repurposed for COVID-19 by virtual screening of 6,218 drugs and cell-based assay.* ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 2021. **118**(30).
8) Khoury, D.S., et al., *Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection.* ***Nat. Med.***, 2021. **27**(7): p. 1205-1211.

新型コロナウイルスに高い抗ウイルス活性を有する粉体素材の開発

研究責任者　鳥取大学　工学部
機械物理系学科材料工学研究分野
教　授　　陳　　中春
共同研究者　鳥取大学　工学部
機械物理系学科材料工学研究分野
准教授　　音田　哲彦
共同研究者　鳥取大学　医学部
感染制御学講座ウイルス学分野
教　授　　景山　誠二

１．はじめに

2019 年 12 月以降、中国武漢市で発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は世界中で猛威を振るい、甚大な人的・社会的・経済的被害をもたらしている。2021 年 7 月 16 日時点で、日本では合計 831,193 人の感染者、15,014 人の死亡者が確認され、世界においては世界保健機関(WHO)に報告された感染者の累計数は 188,655,968 人、うち死亡者は 4,067,517 人に及ぶ。ウイルスの蔓延を防止する対策として、COVID-19 に対するワクチンの接種や治療薬の開発に加えて、日常生活空間でのウイルス感染のリスク低減が重要であり、抗ウイルス素材とそれを活かしたマスクや防護服等防護具の開発も必要不可欠である。

近年、炭酸カルシウムと炭酸マグネシウムの複塩であるドロマイト($CaMg(CO_3)_2$)を加工した焼成ドロマイトについて菌やウイルスに対して効果的な性能をもつことが報告されている [1-3]。ドロマイト加工材料の抗菌、抗ウイルス効果の特徴として高い即効性があり、また、他の無機系抗菌剤と比較しても、より高い抗ウイルス性能を有する。現在、焼成ドロマイトを特殊加工した抗ウイルスマスクが製品化されている。しかしながら、焼成・水和したドロマイトは、大気や呼気に含まれる二酸化炭素(CO_2)と反応し、炭酸カルシウム($CaCO_3$)へと容易に変化するため、抗ウイルス効果が持続できない欠点がある。著者らは、酸化カルシウム(CaO)に数%酸化アルミニウム(Al_2O_3)を添加し、高温焼成・水和処理した粉末は、鳥インフルエンザウイルスに対して強力な抗ウイルス効果を示すだけでなく、抗ウイルス性が長く持続できることを見出した [4]。また、CaO と Al_2O_3 粉末にメカニカルアロイング処理を施すことによって抗ウイルス活性の耐久性が改善されることを発見した [5]。

本研究では、優れた即効性と持続性を有する新たな抗コロナウイルス素材の開発を目指し、CaO に少量の Al_2O_3 ナノ粒子を添加し、メカニカルミリングにより $CaO\text{-}Al_2O_3$ 複合粉体を合成し、新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性に及ぼす Al_2O_3 の添加やミリング処理の影響を調べることを研究の目的とした。

２．試料合成・評価方法

出発原料として市販の CaO 粉末と Al_2O_3 粉末

を用いた。CaO と Al_2O_3 の混合粉末に対して遊星型ボールミルによるメカニカルミリング処理を施し、粉末の微細化・複合化を行った。得られた粉末に抗ウイルス活性をもたらすために、水和処理を行い、強アルカリ性の水酸化カルシウム（$Ca(OH)_2$)に変化させた。

得られた試料の耐久性を評価するために、人間の呼気を模した加速劣化試験を行った。37℃の CO_2 と水蒸気の過飽和雰囲気に 24 時間暴露し、試料の劣化度を調べた。これは、得られた $Ca(OH)_2$ と CO_2 との反応により $CaCO_3$ が生成し、抗ウイルス活性を失うことになる。

このようにして得られた試料について、X 線回折(XRD)により相同定、結晶子サイズ、導入ひずみ、格子定数を測定した。試料の抗ウイルス効果の目安として pH 測定を行った。抗ウイルス試験は、生理食塩水に試料粉末 100mg/mL を溶解させ、遠心分離後の上清を採取し実験に供した。ウイルスは SARS-CoV-2 (NIID 株)を使用しウイルスと被験検体を反応後、反応を停止させた。Vero-E6/TMPRSS2 細胞に混合物を加え 1 時間細胞に暴露し、その後、5% FBS/D-MEM と置換し、続いて 48 時間した。48 時間後に生存した細胞を WST 法により染色、感染価を $TCID_{50}$ 法で決定した。

3．成果

CaO に対して 0～8h ミリング処理された試料の XRD プロファイルを図 1 (a)に示す。非常に強い CaO のピークとわずかな $Ca(OH)_2$ のピークが観察された。$Ca(OH)_2$ は X 線測定時に大気中の水分と反応したものと考えられる。0h 試料のプロファイルにはシャープなピークが見られるが、ミリング処理により試料粉末が粉砕され、微粉末化されるためピークがブロードになることがわかる。ミリング処理試料のピークはミリング時間とともにわずかにピーク高さが低くなりブロード化するように見られた。図 1(b)に CaO に 5% Al_2O_3 添加試料の XRD プロファイルを示す。Al_2O_3 添加量が少ないため、Al_2O_3 の回折ピークは検出されなかった。添加試料は無添加試料と比べて $Ca(OH)_2$ のピークが少々強かった。これは Al_2O_3 との混合作業があるため混合中に大気中の水分と反応したためと考えられる。Al_2O_3 添加試料は(a)と同様に、ミリング処理により各回折ピークはブロード化していた。プロファイル変化は無添加試料と比べて大きな違いはなかった。

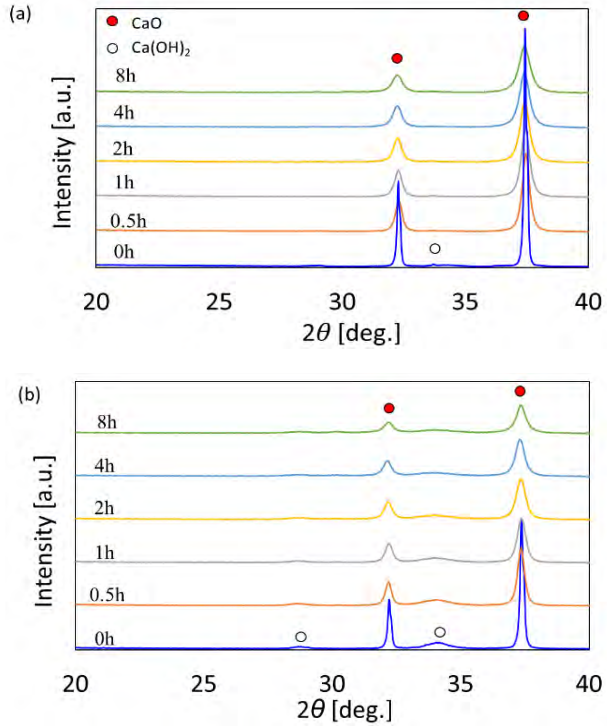


図 1　ミリング処理(0～8h)による XRD プロファイルの変化．(a) CaO, (b) CaO-5% Al_2O_3

CaO に 5% Al_2O_3 添加した試料の水和処理後の XRD プロファイルを図 2 に示す。水和処理により CaO は $Ca(OH)_2$ へと変化しており、CaO のピークは観察されなかった。しかし、非常に弱い $CaCO_3$ のピークが見られた。これは大気中の CO_2 により $Ca(OH)_2$ が炭酸化されたと考えられる。水和処理試料に観察されたピークは図 1 とは異なり、ミリングの有無にかかわらずすべてシャープなものであった。そのため、X 線プロファイルを見る限りはミリングにより導入されたひずみや微粉末化の効果の大部分は解消されたように思われる。また、Al_2O_3 添加の有無や添

加量による違いは特に観察されなかった。

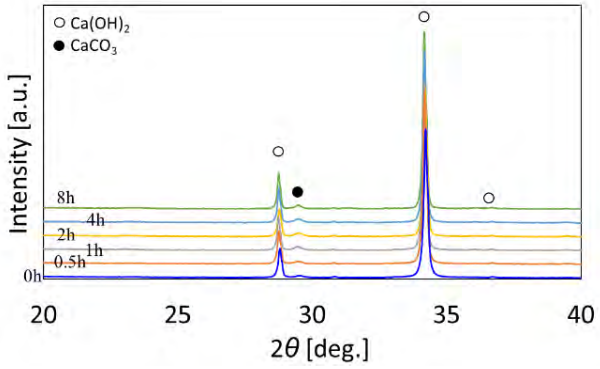


図 2　0～8h ミリング処理された CaO-5% Al_2O_3 試料の水和処理後の XRD プロファイル

CO_2 雰囲気下で劣化処理された試料の XRD プロファイルを図 3 に示す。これから水和試料の $Ca(OH)_2$ は $CaCO_3$ に変化したことがわかる。しかし試料の一部には $Ca(OH)_2$ の残存ピークがあることがわかる。そのピーク高さはミリング時間とともに大きくなっているように見られた。

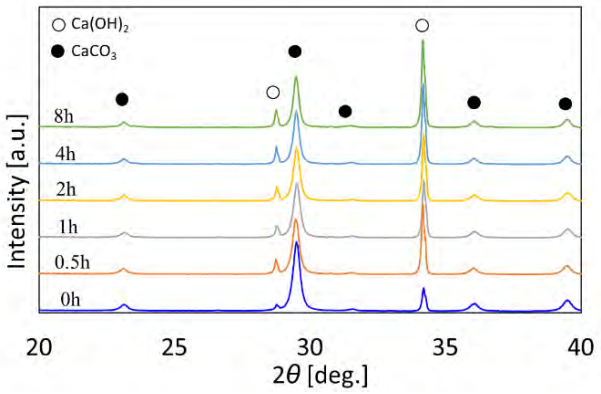


図 3　0～8h ミリング処理された CaO-5% Al_2O_3 試料の水和・劣化処理後の XRD プロファイル

これらの XRD プロファイルから、ミリング処理により粉砕された試料の結晶子径を見積もった結果を図4に示す。これらからわかるように、原料粉末としての CaO の結晶子径は 10nm 程度であるが、それがミリング処理により 0.5h ですぐに 5nm 程度に微細化され、その後はミリング時間によらずほぼ一定となっている。これは Al_2O_3 添加の有無にかかわらず同様の傾向を示した。

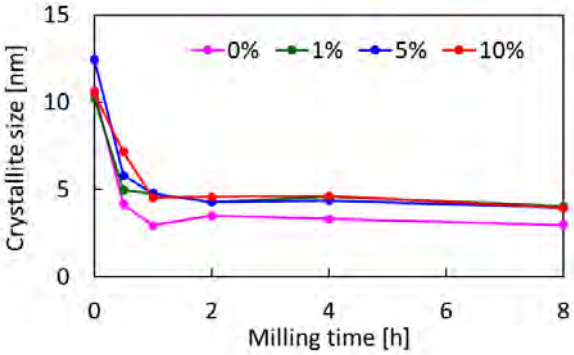


図 4　ミリング処理された CaO-Al_2O_3 粉末の結晶子径とミリング時間の関係

同様に X 線プロファイルから得られた、ミリング処理によって導入されたひずみを図 5 に示す。ミリング処理によりひずみが導入されるが、ミリング時間を長くするとそのひずみが減少する傾向がみられた。これはいずれの試料でも同様の傾向を示した。Al_2O_3 無添加試料ではひずみの導入に時間が要する傾向を示し、またそのひずみ量も添加試料に比べると小さい。一方 Al_2O_3 添加試料では 0.5 から 1h 程度で最大のひずみ量となり、その後ミリング時間とともにひずみが小さくなった。

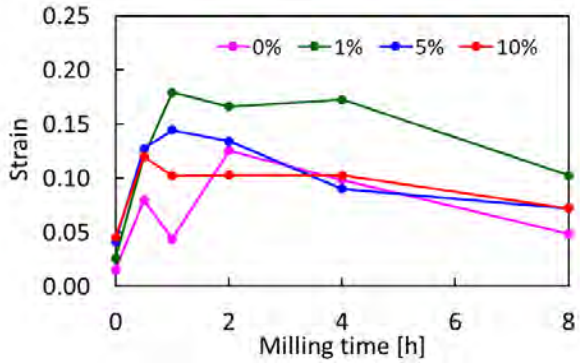


図 5　ミリング処理された CaO-Al_2O_3 粉末に導入されたひずみとミリング時間の関係

CaO のミリング処理時間に対する格子定数の変化を XRD 測定より求めた結果を図 6 に示す。これより、Al_2O_3 添加試料と無添加試料で異なる変化を示した。Al_2O_3 無添加試料については短いミリング時間では変化がほとんどなくその後変

化が見られた。一方、Al_2O_3 添加試料はミリング処理時間に対する格子定数の値は添加量に依存せずほぼ同様の傾向を示し、2 時間まで格子定数が急激に大きくなり、その後はほぼ一定の値となった。Al_2O_3 の添加量に対しては格子定数の違いはほとんど見られず、格子定数を見る限りは添加量が格子定数に影響を与えていないように見えた。一般に高エネルギーボールミルにより合金化（メカニカルアロイング)されると考えられるが、格子定数測定からはその傾向は見られなかった。以上のことから、格子定数に対しては Al_2O_3 添加の有無の影響が顕著にみられ、添加試料についてはミリング時間に大きく依存性が見られ、添加量に依存しないということがわかった。

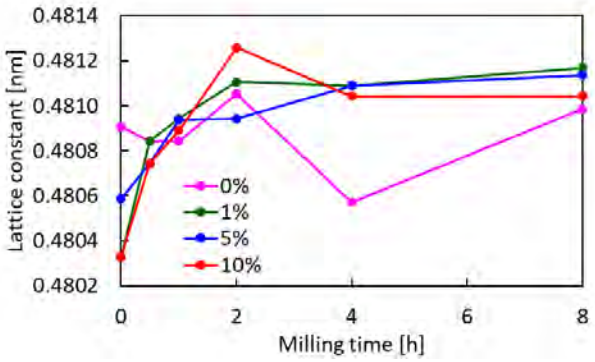


図 6　ミリング処理された $CaO\text{-}Al_2O_3$ 粉末の格子定数とミリング時間の関係

CaO を水和処理された試料は $Ca(OH)_2$ により 12 を越える高い pH 値が測定された。図 7 に、本試料の CO_2 雰囲気による劣化試験後の pH 測定結果を示す。これらからわかるようにミリング処理なしの試料(0h)では pH 値がばらつき、Al_2O_3 無添加試料では 9 以下の低い値となっている。それに対してミリング処理試料ではいずれの試料でも 12 を越える値を示した。特に、Al_2O_3 添加試料ではミリング処理なしであっても比較的高い pH 値を示した。一方 Al_2O_3 無添加試料ではミリング処理時間とともに pH 値が高くなる傾向がわかり、ミリング処理が耐久性向上に有効であることがわかる。

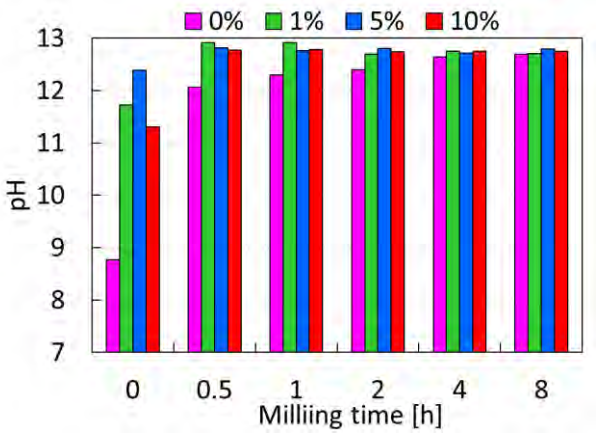


図 7　劣化処理後の各粉末試料の pH 値の変化

抗ウイルス試験については、今回は時間の制限もあり 5% Al_2O_3 添加のミリング処理時間 1h、4h 試料と、比較のために $Ca(OH)_2$ 試薬についてのみ新型コロナウイルス（SARS-CoV-2)による評価を行った。培養 48h 後の感染価が、ミリング処理 1h 試料では対照 $10^{5.5}$ に対して濃度が 1mg/mL、10mg/mL ではともに $10^{5.7}$ と変化がなかった。一方、ミリング処理 4h 試料では、1mg/mL の上清にウイルスを失活する効果がみられた。さらに、高い濃度（10mg/mL)でウイルスを失活させる効果が増強した。このように、Al_2O_3 の添加とミリング処理の結果、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 を失活させる効果があることが確認されたが、今後、複合粉末の作製プロセスの最適化により抗ウイルス活性のさらなる向上が必要である。

4．まとめ

CaO に遊星型ボールミルを用いたメカニカルミリング処理により、5nm 程度の結晶子径を有する微細粉末の作製に成功した。これは 0.5h 程度で得られ、それ以上ミリング処理をしても細かくはならなかった。ミリング処理によるひずみは 1h 程度まで増加するが、それ以上のミリング処理ではわずかに減少した。また、ミリング処理された粉末の格子定数は Al_2O_3 添加試料ではわずかに大きくなるが Al_2O_3 の添加量にはよらなかった。

CaO にミリング処理を施すことで CO_2 による劣化が抑制された。特に、Al_2O_3 を添加すると短時間のミリング処理で劣化が抑制でき、抗ウイルス活性の持続性の向上に寄与する。

本実験の範囲では、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス効果については、ウイルスを失活させる効果があることを示した。今後、Al_2O_3 の添加量やミリング時間などプロセスの最適化を行うとともに、抗ウイルス活性の向上のメカニズムを解明していきたい。また、抗ウイルス試験の条件をさらに見直しをして進めていきたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の研究助成を受けて実施されたものであり、ここに記して深甚な謝意を表します。また、研究の遂行にあたり実験で多大な協力を頂いた鳥取大学医学部の金井亨輔先生、鳥取県産業技術センター機械素材研究所の田中俊行研究員、当研究室の大学院生の大西健翔さんに感謝いたします。

参考文献および発表論文

1）H. Yamana, K. Otsuki, H. Ito, T. Ito, T. Murase, K. Wakabayashi, and N. Miyoshi, “Strong antibacterial activity of resins with additions of hydrated dolomite,” *J. Vet. Med. Assoc*., 58 (2005), 201-204.

2）H. Yamana, H. Ito, T. Ito, T. Murase, K. Motoike, K. Wakabayashi, and K. Otsuki, “Strong antiviral activity of heated and hydrated dolomite - preliminary investigation,” *J. Vet. Med. Sci.,* 69 (2007), 217-219.

3）K. Motoike, S. Hirano, H. Yamana, T. Onda, T. Maeda, T. Ito, and M. Hayakawa, “Antiviral activities of heated dolomite powder,” *Biocontrol Sci*., 13 (2008), 131-138.

4）Z. Chen, Y. Miyauchi, K. Motoike, T. Onda, T. Akao and M. Nagashima, “Effect of alumina on antiviral activities of calcium oxide,” *Proceedings of 2012 Powder Metallurgy World Congress*, (2012), pp. 1-6.

5）T. Onda, Y. Yoneda, T. Akao, K. Motoike, H. Ito, T. Ito and Z. Chen, “Preparation of a novel antiviral material by mechanical milling,” *Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy*, 63 (2016), 668-674.

6）大西健翔，衣立夫，音田哲彦，陳中春，抗ウイルス性セラミックス粉体材料の合成および耐久性向上，日本金属学会中国四国支部第 61 回講演大会(オンライン会議), 2021 年 8 月

心拍変動解析に基づく COVID-19 重症化予測機械学習アルゴリズムの開発研究

研究責任者　名古屋大学　工学研究科
物質プロセス工学専攻
准教授　　藤原　幸一

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）では，重症化する割合は従来株でも 20%程度だが，自覚症状と検査所見に甚だしい乖離を認めることがあり（"happy hypoxia"等），不意にかつ急速に呼吸不全に至る事例が報告されている．こうした急速な状態変化は，入院中はもちろん、自宅経過観察時にも報告されており，救命率向上のためには院外における重症化検知が必要である．

COVID-19 では呼吸器症状に加えて様々な神経学的所見も報告されている[1,2]．過去の SARS-CoV・MERS-CoV では気道のみならず神経系感染も知られ、重度の脳幹感染例が報告されている[3]．今回の SARS-CoV-2 でも同様に嗅神経等を経由した神経系への感染が示唆されている[4]．脳幹部感染は，呼吸中枢とともに解剖学的に近傍の迷走神経中枢，即ち自律神経系にも影響を与えると考えられる[5]．

自律神経活動の評価方法として心電図に基づく心拍変動（HRV）解析がある．COVID-19 においても，HRV 指標のひとつである SDNN が COVID-19 を発症すると低下し，その後回復すると SDNN が元に戻るという報告がある（Baumann et al. 2020）．そこで，重症化検知のために HRV 解析を利用できると考えられる．そこで，既存医療機器から得られる HRV などの生理指標を入力として、COVID-19 による呼吸不全の兆候を早期検知する AI の開発を着想した．

２．内容

COVID-19 による呼吸不全の兆候を早期検知する AI の開発のためには，多くの呼吸不全・肺炎重症化前後の臨床データが必要である．そこで関西の新型コロナ患者専用病棟を有する病院において，患者の入院時に蓄積されたデータの観察研究として臨床データを収集した．このときベッドサイドモニタより，心電図や SpO2 などのデータを抽出する必要があったため，ベンダで協力して図 1 に示すシステムを開発しデータを抽出しデータベース化を試みた．

臨床データはネットワーク経由では取得できないため，3 月末に一時期緊急事態宣言が解除された際に，当該病院を訪問して，少数のテストデータを HDD にコピーし，ローカル PC にて解析を試みた．

３．成果

データ収集期間は 2021 年 2 月上旬～4 月上旬であり，対象となったのは中等症以上の COVID-19 患者 51 名である．

ひとりあたりの測定期間は最短 1 日であったが，最長 28 日とかなりばらつきがあった．これはどの程度，コロナ患者専用病棟に入院しなければならなかったによる．取得したデータは合計 743 時間分であった．なお，本データ収集・解析は，デ

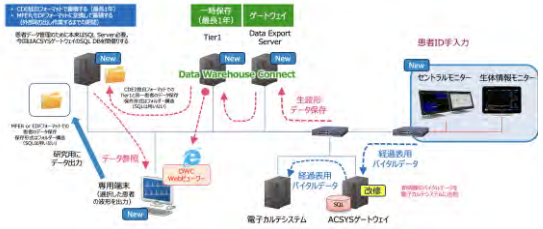


図 1：臨床データ抽出システム

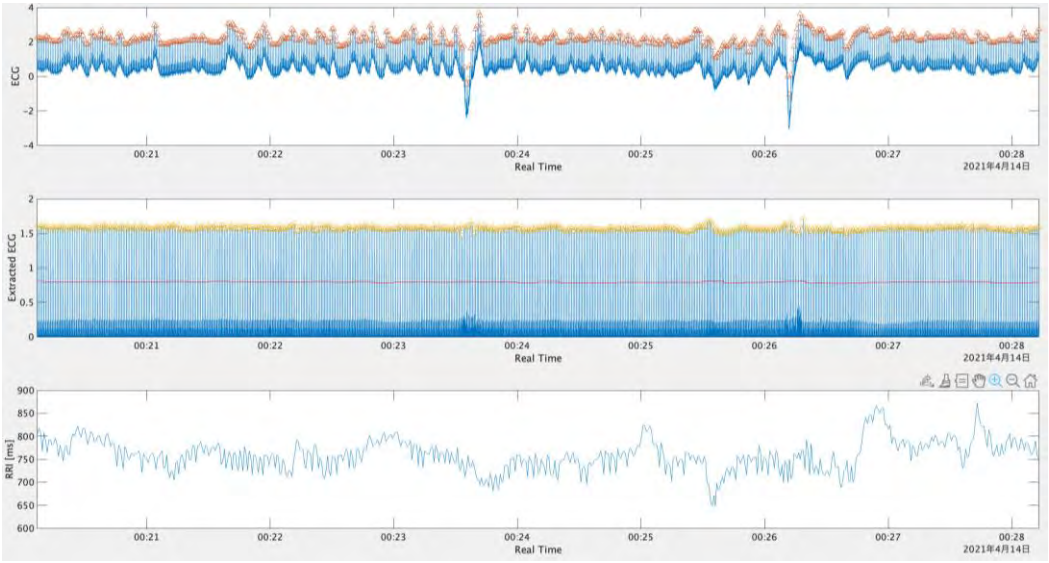


図 2：中等症程度患者の心電図・RRI

ータ収集施設での倫理審査承認の上，実施している．

図 2 に中等症程度患者の心電図と RR 間隔(RRI)を示す．この測定期間には特に臨床上，重要なイベントは発生していない．この図より，中等症程度であれば，ECG は綺麗に記録できることがわかる．

一方，図 3 は重症患者の心電図と RRI であるが，長期間にわたり不整脈が頻発していることがわかる．この患者は特に循環器関係の既往歴はなく，また測定期間には臨床上重要なイベントは発生していないが，COVID-19 が心肺機能に影響していることが確認された．

図 4 は図 3 と同じ重症患者であるが，退院直前の心電図と RRI である．図 4 より，COVID-19 より回復することで，不整脈の頻度が大幅に減少していることがわかる．その他の患者でも類似のデータが確認されており，COVID-19 と心拍の変化には関係があることが示された．

4．まとめ

本研究では，患者の臨床データを収集することで，COVID-19 と心拍との関係について，確認することができた．今後は収集したデータを解析して，COVID-19 による重症化を検知できる AI の学習に取り組む．

謝辞

本研究は，公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の助成により研究が遂行されたものです．この場を借りて深く御礼申し上げます．

参考文献および発表論文

1）Mao L, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. JAMA Neurol. 2020 Jun 1;77(6):683-690.

2）Wu F, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020 Mar;579(7798):265-269.

3）Arabi YM, et al. Severe neurologic syndrome associated with Middle East respiratory syndrome corona virus (MERS-CoV). Infection. 2015 Aug;43(4):495-501.

4）Rao W. et al. Regenerative Metaplastic Clones in COPD Lung Drive Inflammation and Fibrosis. Cell. 2020 May 14;181(4):848-864.e18.

5）Wijdicks EFM. The neurology of acutely failing respiratory mechanics. Ann Neurol. 2017 Apr;81(4):485-494

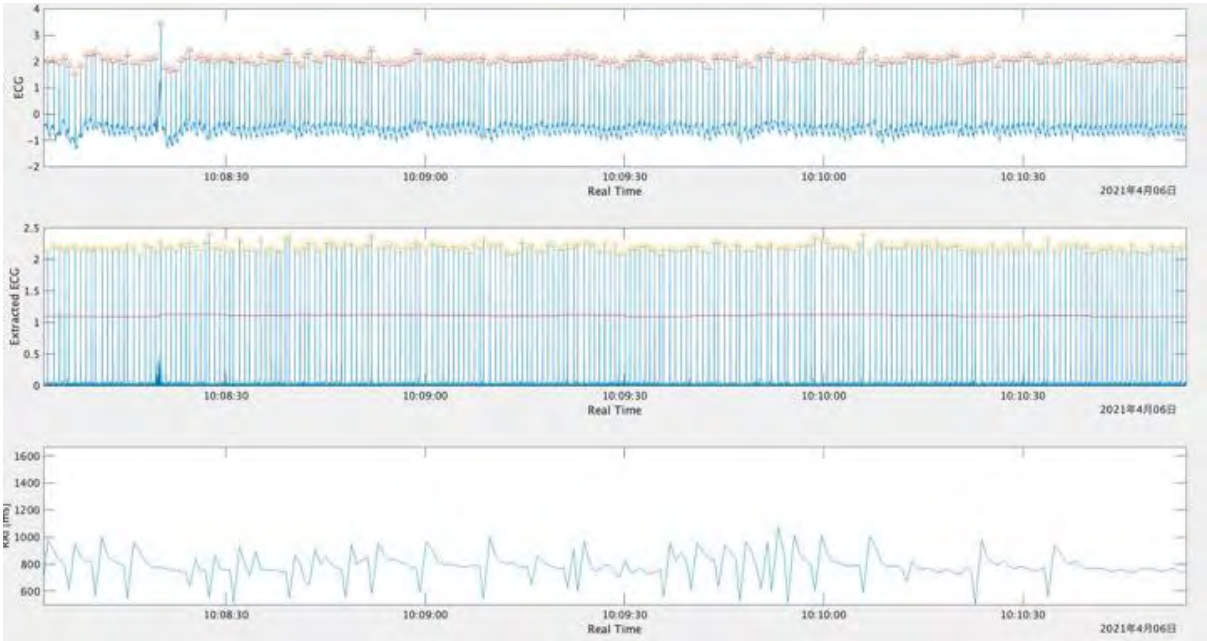


図 3：重症患者の心電図・RRI

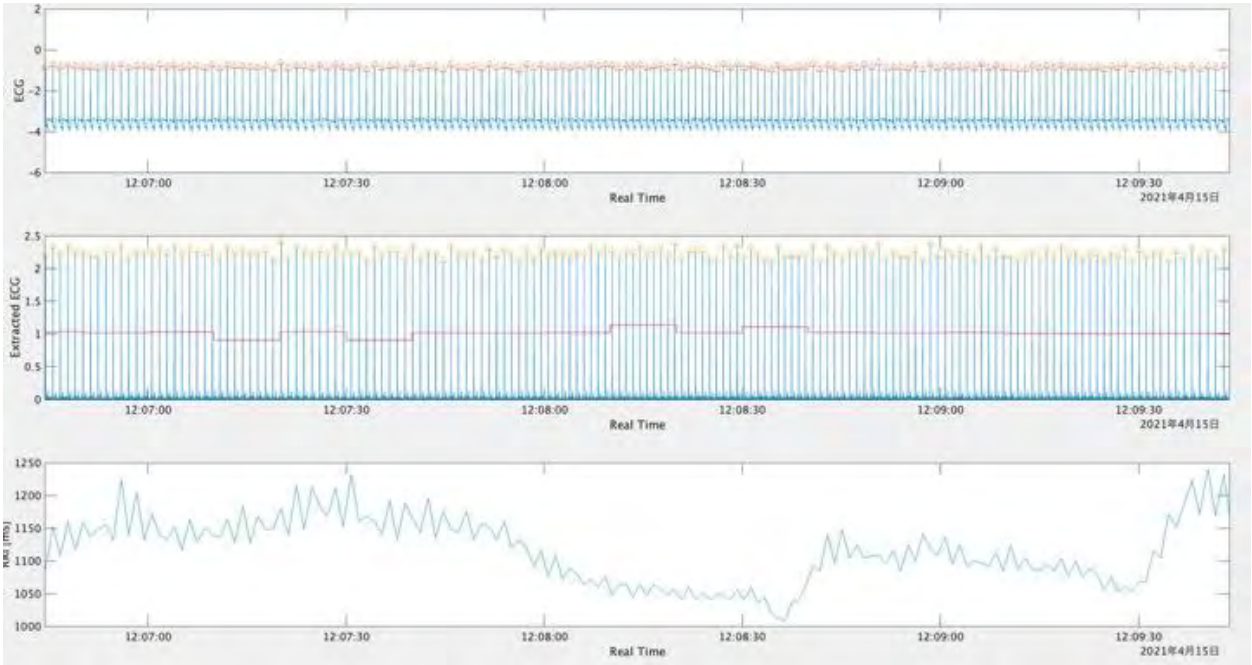


図 4：重症患者の退院直前の心電図・RRI

5) Baumann T, et al. CLL and COVID-19 at the Hospital Clinic of Barcelona: an interim report. Leukemia. 2020 Jul;34(7):1954-1956.

ハイスループット微粒子誘電泳動 DNA 検出法の開発

研究責任者　九州大学　大学院システム情報科学研究院
電気システム工学部門
准教授　　中野　道彦

1．はじめに

新型コロナウイルス感染症の診断には、主に、抗原抗体反応を用いた抗原検査や抗体検査と、核酸増幅検査が用いられている。抗原（抗体）検査はイムノクロマトグラフィー法によって簡便で短時間に実施できる一方で、感度や選択性（正確性）が核酸増幅検査に比べて低い。PCR（polymerase chain reaction）などを用いて検出対象の遺伝子を増幅して検出する核酸増幅検査は、高感度で選択性が高いが、抗原検査に比べると検査時間が長く高コストである。検査時間やコスト高の要因の一つは、増幅 DNA（または RNA）の検出にある。Real-time PCR は、DNA 増幅に伴う蛍光量の増加を増幅反応中に検出する仕組みにより反応後のプロセスを省略する。そのため、Real-time PCR は、高感度で迅速な核酸増幅検査法としてゴールドスタンダードとなっている。しかし、蛍光検出のための光学系を組み込んだ装置は高価であり、それが一因となって普及が妨げられている。

筆者らは、通常の PCR による増幅 DNA を迅速かつ簡便に検出する手法として、微粒子誘電泳動 DNA 検出法を開発した [1), 2)]。この手法は、増幅 DNA を誘電体微粒子に結合した後、DNA 結合微粒子を誘電泳動によって微細電極に捕集し検出する。誘電体微粒子の誘電泳動は DNA 結合によって大きく変化し、検出対象 DNA が結合した微粒子のみを選択的に微細電極に捕集させることが可能である。そして、捕集に伴う微細電極のインピーダンス変化を捕集と同時に計測して、増幅 DNA を定量検出する（図 1）。この手法は、等温 DNA 増幅法と組み合わせることも可能で、その場合はより安価な装置で実施可能である [3)]。

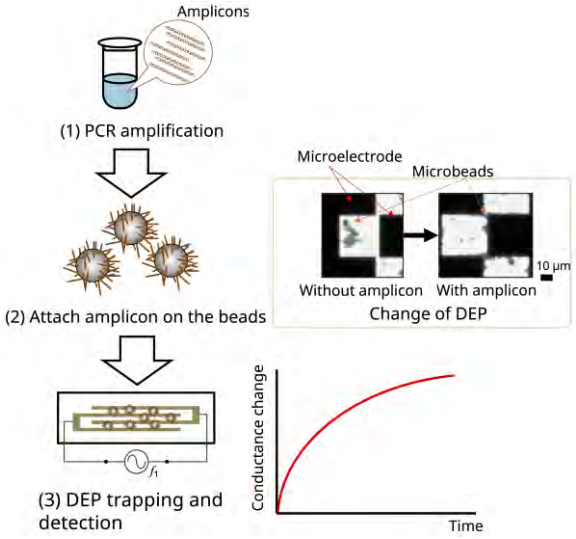


図 1　微粒子誘電泳動 DNA 検出法の概要 [5)]

2．内容

微粒子誘電泳動 DNA 検出法は、Real-time PCR と同等の感度を有しながら、より安価に実施することが可能である。しかし、多くの Real-time PCR 装置が多検体を同時に処理できるのに対して、微粒子誘電泳動 DNA 検出法は、増幅 DNA の検出を 1 サンプルごとに実施する必要

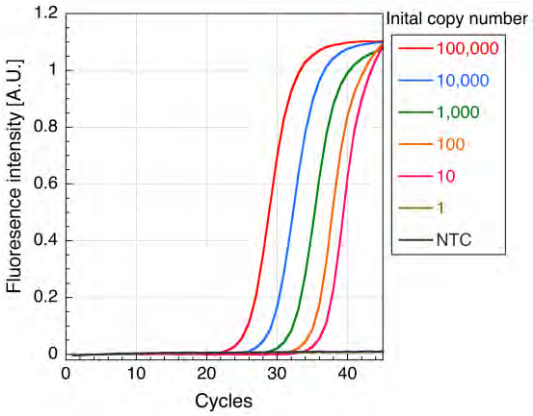
があった。そこで本研究では、並列検出可能なシステムを構築することを目的とした。

まず、新型コロナウイルス遺伝子の検出に関して、Real-time PCR と微粒子誘電泳動 DNA 検出法を比較した。その後、並列処理可能なシステムの構築に取り組んだ。また、微粒子を用いたより簡便な増幅 DNA の検出手法を開発した。

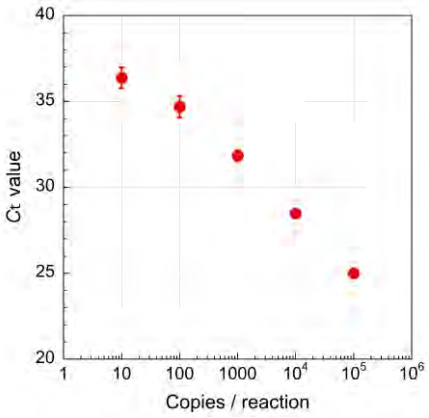
3． 成果

3.1 新型コロナウイルス遺伝子の検出 [5)]

新型コロナウイルス遺伝子として、SARS-CoV-2 遺伝子を組み込んだ陽性コントロール DNA （ 2019-nCoV_N_Positive Control, Integral DNA Technologies）を用い、国立感染症研究所が作成したプロトコール（2019-nCoV Ver.2.9.1）に従って Real-time PCR を行った [4)]。



(a) 増幅曲線

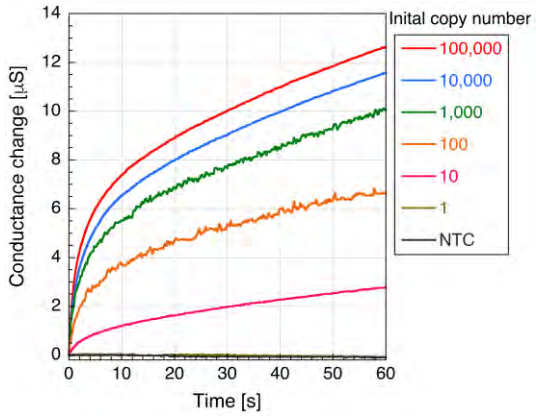


(b) コピー数ごとの Ct 値のプロット

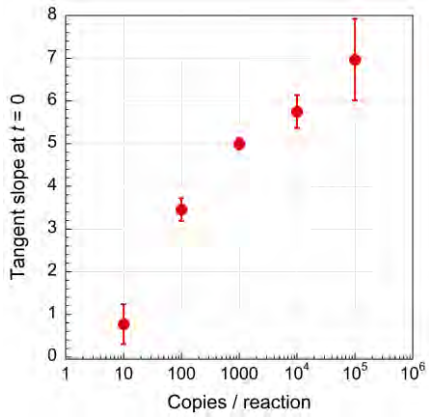
図 2 Real-time PCR による新型コロナウイルス遺伝子の検出結果 [5)]

微粒子誘電泳動 DNA 検出法と組み合わせる際には、Real-time PCR に用いるプローブ DNA を添加せず、一つのプライマーの 5'末端をビオチン修飾した。微粒子にはストレプトアビジン修飾微粒子を用いた。

図 2 に Real-time PCR の結果を、図 3 に微粒子誘電泳動 DNA 検出法の結果を示す。いずれにおいて、10 コピーの新型コロナウイルス遺伝子が検出可能であることが示された。また、10～100,000 コピーの範囲において、微粒子誘電泳動 DNA 検出法の定量性は、Real-time PCR と同程度であることが示された。微粒子誘電泳動 DNA 検出法は、PCR 後の増幅 DNA を検出するため、反応がプラトーに達してしまうと、その範囲において定量判定することができない [2)]。ここでは、それを防ぐために、PCR のサイクル



(a) コンダクタンス変化



(b) コピー数ごとのコンダクタンス曲線の傾き

図 3 微粒子誘電泳動 DNA 検出法による新型コロナウイルス遺伝子の検出結果 [5)]

数を Real-time PCR よりも 5 サイクル少なくした。それによって、同程度の定量性が示された。

3.2 並列処理システムの構築

微粒子誘電泳動 DNA 検出法は、ロックインアンプを用いて実施する。ロックインアンプ による正弦波出力を誘電泳動捕集およびインピーダンス測定のための電源とし、出力正弦波を基準波形として回路に流れる電流をロックイン検波し、印加電圧と回路を流れる電流およびその位相からインピーダンスを計算する。並列化するために、マルチプレクサを用いて入出力を並列化し、また、微細電極を一つの基板上に複数設置した。それによって、4 サンプル同時に処理可能になった。また、より安価な装置を実現するために、小型計測デバイス（Analog Discovery 2, Digilent）を用いた計測システムを構築した。LabView 上でロックイン検波を実装して試験をしたところ、従来と同程度の測定能であることが示された。従来用いているロックインアンプは数十万円以上であるのに対して、小型デバイスは数万円であり、大幅なコストダウンが見込める結果を得た。

3.3 磁性微粒子を用いた増幅 DNA の目視判手法の開発 [6)]

微粒子誘電泳動 DNA 検出法では、増幅 DNA を微粒子に結合して検出する。その実験に家庭において、新たな簡易増幅 DNA の検出手法を見出した。

その手法は、微粒子に磁性微粒子を用いる。まず、増幅 DNA を磁性微粒子に結合する。そして、その DNA 結合微粒子を親水性基板上に滴下する。そして、基板下面に永久磁石を置く。そうすると、DNA が結合した磁性微粒子は、永久磁石の中心付近に凝集し、その一方で、未結合磁性微粒子は底面に均一に付着する。この違いは、目視可能である。

図 4 は、PCR 増幅した新型コロナウイルス遺伝子を磁性微粒子に結合して検出した例を示す。

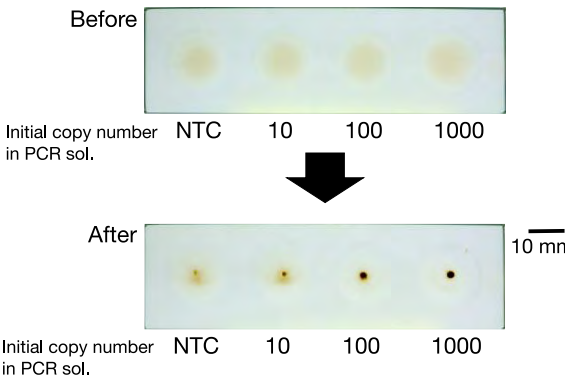


図 4 DNA 結合磁性微粒子の凝集の様子 [6)]

NTC は non-template control を示し、検出対象 DNA がない PCR サンプルを用いたものである。数字は PCR に導入したコピー数を示しており、10 個以上で微粒子の凝集が見られた。

磁性微粒子の凝集は 1 分以内に完了するため、従来のゲル電気泳動法に比べて迅速で、Real-time PCR のような蛍光検出に比べて安価に実施可能である。

4．まとめ

Real-time PCR に代わる安価で迅速な核酸増幅検査手法として開発した微粒子誘電泳動 DNA 検出法を発展させるための研究を行った。新型コロナウイルス遺伝子の検出において、Real-time PCR と同等の感度、定量性であること示した。並列処理可能なシステムの構築を試み、4 サンプル同時に計測可能であることを示した。新たな増幅 DNA の検出法として、磁性微粒子を用いた目視判定手法を開発した。

謝辞

本研究は、公益財団法人　中谷医工計測技術振興財団（新型コロナウィルス感染症対策助成プログラム）の助成を受けて実施した。ここに謝意を表します。

参考文献および発表論文

1) M. Nakano, Z. Ding, H. Kasahara, J. Suehiro, “Rapid microbead-based DNA

detection using dielectrophoresis and impedance measurement," Europhysics Letters, Vol. 108, 28003, 2014.

2) M. Nakano, Z. Ding, J. Suehiro, "Comparison of sensitivity and quantitation between microbead dielectrophoresis-based DNA detection and real-time PCR," Biosensors, Vol. 7, 44, 2017.

3) M. Nakano, S. Kalsi, H. Morgan, "Fast and sensitive isothermal DNA assay using microbead dielectrophoresis for detection of anti-microbial resistance genes," Biosensors and Bioelectronics, Vol. 117, pp. 583-589, 2018.

4) K. Shirato, N. Nao, H. Katano, I. Takayama, S. Saito, F. Kato, H. Katoh, M. Sakata, Y. Nakatsu, Y. Mori, T. Kageyama, S. Matsuyama, M. Takeda, "Development of genetic diagnostic methods for detection for novel coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan," Japanese Journal of Infectious Disease, Vol. 73, pp. 304-307, 2020.

5) 中野道彦, 稲葉雅文, 末廣純也, "微粒子誘電泳動 DNA 検出法による新型コロナウイルス遺伝子の検出," 電気学会論文誌 E (センサ・マイクロマシン部門誌) , Vol. 141, pp. 233–236, 2021.

6) M. Nakano, M. Inaba, J. Suehiro, "Rapid and low-cost amplicon visualization for nucleic acid amplification tests using magnetic microbeads," Analyst, Vol. 146, pp. 2818–2824, 2021.

新型コロナウイルス感染症診断の自動化システム確立のための基礎研究

研究責任者　大阪医科薬科大学
研究支援センター
特務助教　　永塚　健宏

１．はじめに

新型コロナウイルスの蔓延から 1 年以上が経過するが、変異株の出現など未だに収束の兆しが見えない。現在、新型コロナウイルスは PCR 法による診断が主流となっているが、サンプルからの核酸抽出、測定から結果までに時間が掛かる事が課題となっている。現在は新興感染症の判定に限らず、予防医学の観点からも早期診断のためのバイオマーカーをターゲットにした迅速な検知システムの構築は重要性が増している。申請者はより簡便で迅速な判定方法として抗体とナノマテリアルを組み合わせたセンサーチップにバーコードによる読み取り機能を付加した新しい検知システムを考案した。本法は様々な抗体を組み合わせてバーコードパターンを形成させることにより、１枚のチップで多彩な診断が可能となる。

２．内容

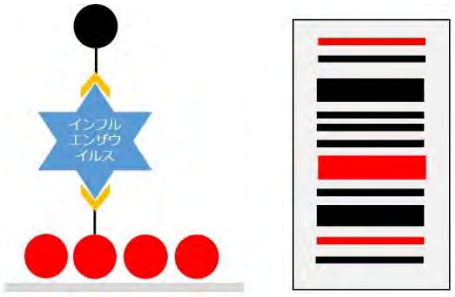
本システムはセンサーチップと反応増強物質、バーコード読み取り機から構成される。

①センサーチップの作製：20㎜×10 ㎜角のプラスチック基板にアミノシラン処理を行い、そこに金ナノ粒子を図のような線状のパターンで固定化する。この固定化した金ナノ粒子にスペーサー分子を介して抗体を結合させる。

②エンハンサーとしてのバイオコンジュゲーション金ナノ粒子の作製：フリーの金ナノ粒子に同様にスペーサーを結合、抗体を固定化する（図１真ん中上段）。

③バーコードリーダー：抗原（COVID-19）と反応して凝集した金ナノ粒子の色調変化がバーコード模様を形成するのでそれを読み取り、判定するプログラムを組む。

まず始めにバーコードパターンを持った検知チップを作製した（図１）。検知チップはスライドガラスを piranha 溶液で洗浄後、アミノプロピルメトキシシランによってシラン処理を行った。そこに金ナノ粒子を固定化(45rpm, rt, 20hr)した。この金ナノ粒子の表面に NHS 活性基とチオール基をもつアルキルスペーサーを自己組織化により固定化（金－チオール結合）した。NHS 活性基は蛋白質のアミノ基と結合するので、抗体溶液を掛けて、乾かないように注意しながら冷蔵庫で 1 晩反応させた。その後、抗体溶液を洗い流し、検知チップの完成とした。実験は感染性の新型コロナウイルスを用いる前に予備実験として脱核したインフルエンザウイルスとインフルエンザウイルスの膜に存在するヘマグルチニン蛋白質の抗体を用いて行った。その結果、金ナノ粒子の色調変化ではバーコード化が不十分である事が判明した。そこでバーコードの黒色を再現するためにターゲット蛋白質を捕捉した検知チップに酸化鉄粒子を結合させることにした（スキーム 1)。



スキーム1 抗原抗体反応のサンドイッチ法を利用した酸化鉄微粒子の黒色によるバーコードパターン形成

酸化鉄表面はカテコール基を持つ分子が吸着する事が知られている。そこでカテコール基とカルボキシル基を持つアルキルスペーサーを混ぜて作製した。酸化鉄粒子に結合させた後、カルボキシル基に N-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させて NHS 活性基を合成した。各ステップの反応混合液は遠心分離（15000rpm，4℃，15 分）により酸化鉄微粒子を沈降させて、上澄み液を取り除き精製した。その酸化鉄微粒子を PH8 に調節した PBS 緩衝液に分散させてヘマグルチニン抗体と反応させた（50rpm，rt，4hr）。遠心分離によって未反応の抗体を除去し、中性の PBS(-)溶液に再分散させて反応増強物質とした（図 2)。

3． 成果

学生実習、学生の研究指導、科研費申請の準備（今年度獲得内定）などで忙しくなり、手が回らなくなってしまい、研究が停滞しているため、顕著な成果が出ていない。

4． 今後の検討

研究のストラテージは定まっているが人手不足のため思うように研究が進まない状況にある。現在、共同研究企業、大学などを探している。もう少しまとまった結果が出たら学会に参加して宣伝する予定です。

謝辞

今回、私のアイデアを採用して戴き、研究助成をして戴ました事に感謝とお礼を申し上げます。この機会を足掛かりに研究を発展させて、安心安全な社会の構築に向けて貢献したいと思います。

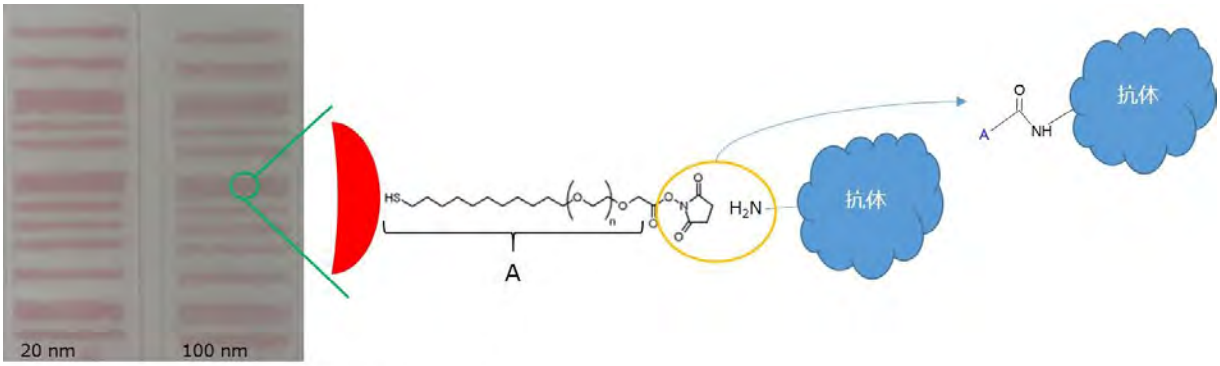


図1 バーコードパターンに金ナノ粒子を固定化したセンサーチップ

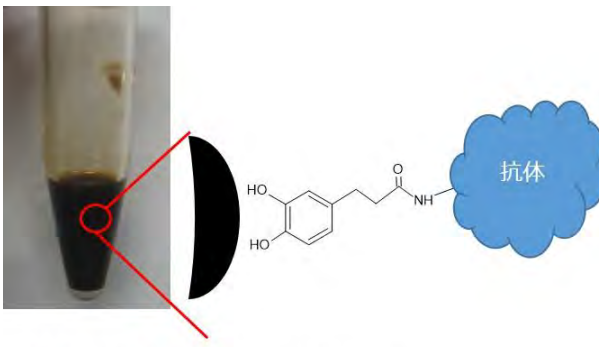


図2 抗体を結合させた酸化鉄微粒子（反応増強剤）

新型コロナウイルスを一重項酸素を用いて不活性化する空気清浄・殺菌装置の開発

研究責任者　広島大学　大学院統合生命科学研究科
生命環境総合科学プログラム
特任教授　　佐久川　弘

１．はじめに

従来の空気清浄化装置は、空気中に浮遊するウイルスの不活性化に関しては残念ながら非力である。活性酸素の一種である一重項酸素（$^1O_2$）がさまざまなタイプのウイルスの不活性化に有効であることは医学的に解明され、現在は光線力学療法（Photodynamic therapy）として用いられている。この療法では、光増感剤を生体内に注入し標的となるガンや感染症の病巣で光励起させて$^1O_2$を発生させる[1)]。$^1O_2$が、HIV（エイズ）ウイルス、インフルエンザウイルス、センダイウイルス、デング（テング熱）ウイルス、アデノウイルスなどの不活性化を引き起こすことが確認されている[1)-3)]。Covid-19ウイルスと同属である中東呼吸器症候群（MERS）コロナウイルスも不活性化することが最近明らかとなっている[4)]。広島大学は、本研究の研究パートナーである横田工業商会とともに、空気中に浮遊するインフルエンザウイルスなどを一重項酸素を用いて不活性化する清浄方式を考案し、特許を取得した（特許424167，空気浄化装置：ウイルス不活性装置及びウイルス不活性方法、2013年）。一重項酸素は光照射時のみに発生し、また空気中での寿命は短く、数秒以内で普通の酸素分子（三重項酸素：$^3O_2$）に戻るので安全である。また、可視光LEDを光源として用い、有害な紫外線（UV）などは用いないので、人体にも安全である。オゾンと異なり、光増感剤として用いるローズベンガルは食紅に使用されることから分かるように安全性が高い物質である。既存の空気清浄機等で用いられている清浄・殺菌方式は、活性炭やHEPAフィルター等への吸着、オゾン、紫外線、TiO_2光触媒、そしてプラズマクラスターイオン、ナノイーなどのOHラジカルを発生させる活性酸素発生方式である。一重項酸素は、様々なタイプのウイルスの不活性化に特に有効であると医学的に確認されている活性酸素である。なお、一重項酸素は、ウイルスだけに有効ではなく、感染症を引き起こす多くの細菌（バクテリア）にも有効であり、グラム陰性菌、グラム陽性菌の両方の不活性化を引き起こすことが報告されている[5)-6)]。

本研究では、ローズベンガル（赤色色素）をエアフィルターにコーティングして光照射して$^1O_2$を発生させ、空気清浄・殺菌に役立てることを目的に、一重項酸素発生装置の開発を行ったので報告する。

２．方法

市販の不織布製エアフィルターに一定量のローズベンガルをフィルター表面にコーティングし、ローズベンガル塗布エアフィルター（赤色）を作製した。作製したエアフィルターに可視LED光（白色）を照射した。光照射で発生した$^1O_2$は、Sunday and Sakugawa（2020）[7)]の方法で測定した。すなわち、酸素気流下でフルフラールアルコールを溶解した重水（D_2O）に導入し、フルフラールアルコールと反応させた。反応物は、高速液体クロマトグラフー紫外吸光光度計を用いて測定し、エ

アフィルター単位面積当たり単位時間当たりの $^1O_2$ 発生速度を求めた。

３．成果

3.1　一重項酸素発生量

図１に、ローズベンガル塗布エアフィルターからの光増感作用による $^1O_2$ 発生およびウイルス不活性化の機構を示す。エアフィルター表面

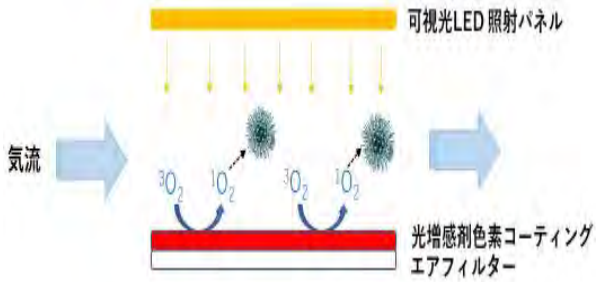


図１　光増感剤から発生する一重項酸素によるウイルス不活性化

で発生した $^1O_2$ がフィルター近傍空間においてウイルスエンベロープを構成する脂質やタンパク質に損傷を与えることにより、ウイルスの不活性化を生じると期待される。発生した $^1O_2$ は数秒以内に $^3O_2$ に戻るので安全である。図２に、光照射により発生した $^1O_2$ の発生速度と可視光（白色）LED の光強度との関係を示す。

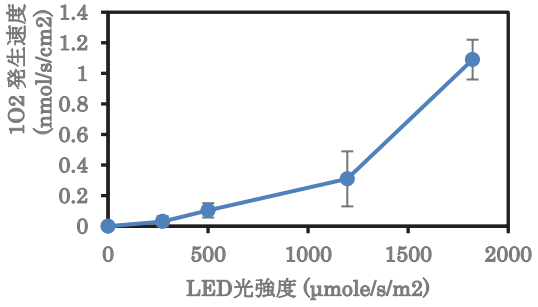


図２　LED 光強度と光増感剤塗布フィルターからの一重項酸素発生速度との関係

$^1O_2$ 発生速度は光強度と比例関係があり、光量子束密度として 1800μmol/s/m^2 で、約 1nmol/s/cm^2 発生した。1800μmol/s/m^2 の光強度は、昼間の太陽光の明るさとほぼ同等である。次に、$^1O_2$ は可視光の中でも緑色域で発生量が最大になることが知られている。そこで、照射光源を可視光（白色）LED から可視光（緑色）LED に変更し照射実験を行い、$^1O_2$ 発生量を測定した。その結果、緑色 LED では光強度で少し（22%）低下するにもかかわらず、$^1O_2$ 発生量は大幅に（77%）低下した（図 3）。したがって、かなり強力な緑色 LED を用いない限り、白

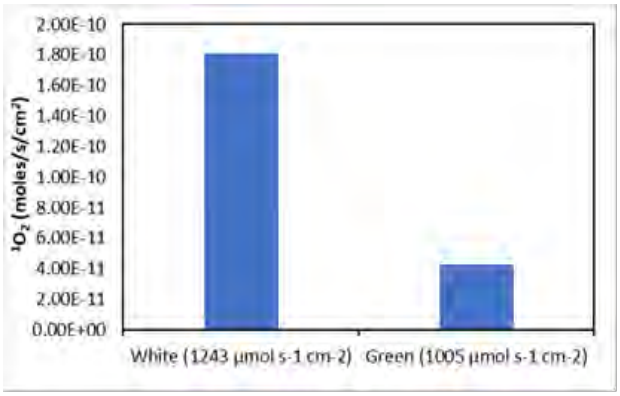


図３ 可視光（白色）LED および可視光（緑色）LED からの一重項酸素発生速度の比較

色 LED と同程度の発生量を達成できないことが明らかとなった。緑色 LED は白色 LED よりも高コストであり、実用的でない。他の種類の LED に関しても検討したが、市販の LED の中では白色 LED が一重項酸素発生に最も適した光源であることが示された。

3.2　フィルターの熱および光安定性

課題は、照射時の LED パネルからの放熱およびエアフィルター上での $^1O_2$ 発生量の熱的変動であった。この課題に関しては、研究パートナー企業と協議を行い、解決策を模索した。その結果、可視光（白色）LED パネル（10×10 cm）の十数カ所に直径十数mmの空気孔を設けることにより、放熱および拡散を速やかに行い、温度上昇を数度以内に抑えることが可能になった。また、LED パネルおよびエアフィルターの配置および相互距離を工夫することにより、またファンからの気流の方向を少し変化させることにより、気流を安定化し、熱的変動を最小限に抑えることが可能になった。

ローズベンガルは長時間の光照射により光分解を起こし劣化する特性があることが明らかと

なった。コーティング量、LED 照射光強度、保湿剤添加により発生量が 2 分の 1 に低下する日数を多少増減することは可能であった。しかし、2 分の 1 に低下する日数を 3 か月～6 か月まで延長させることは困難であった。したがって最終的に、コーティング量（6mL/cm²）、LED 照射光強度（1800 μmol/s/m²）、保湿剤（グリコール系高分子）を用いた場合に、2 か月で $^1O_2$ 発生量の約 50%の低下を確認した。ローズベンガル塗布エアフィルターは効力を保つために数か月に 1 回交換する必要がある。

3.3　空気清浄・殺菌装置の試作

上記の研究の上で、空気清浄・殺菌装置を研究パートナー企業と共同で試作した。製作した試作機は、既存の空気清浄装置本体の中に、ローズベンガル塗布エアフィルター、LED 光照射パネルを組み込んで製作した。今後、実用化に向けて実証実験を実施し、必要に応じて改良を行う予定である。

４．まとめ

ローズベンガルを塗布したエアフィルターから の $^1O_2$ 発生量を測定した結果、可視光（白色）LED を照射光として用いた場合、活性酸素としては高い発生速度を得ることができた。塗布フィルターの熱的および光安定性も良好である。これらの結果をもとに研究パートナー企業と共同で空気清浄・殺菌装置の試作機を製作し、最終的に装置の実用化を図る予定である。製作した空気清浄・殺菌装置からの $^1O_2$ 発生量と新型コロナウイルス不活性化率の相関関係を解明することが今後の課題である。

謝辞

本研究の実施を可能にした中谷医工計測技術振興財団に謝辞を表する。また、研究パートナーである（株）横田工業商会（広島市）のご厚意に御礼申し上げる。

参考文献および発表論文

1）Costa L. et al. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, **4**,1034-1074,2012.

2）Lenard J. et al. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, **90**,158-162,1993,

3）Schagen F.H.E.et al. Photodynamic treatm ent of adenoviral vectors with visible light: an easy and convenient method for viral inactivation. *Gene Therapy*, **6**,873-881,1999,

4）Eickmann, M.et al. Inactivation of Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in platelet concentrates and plasma by ultraviolet C light and methylene blue plus visible light, respectively. *Transfusion*, **58**, 2202-2207, 2018.

5）Hamblin M.R. and Hasan T., Photody namic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Scien.* **3**,436-450,2004.

6）Liu Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J.Clin.Transl.Res.* **1**,140-167, 2015.

7）Sunday M. and Sakugawa H. (2020) A simple, inexpensive method for gas-phase singlet oxygen generation from sensitizer-impregnated filters: Potential application to bacteria/virus inactivation and pollutant degradation. Science of the Total Environment. **746**, 141186.　**（発表論文）**

ファンフィルタユニット（FFU）を用いた陰圧テントによる新型コロナウイルス二次感染防止策

研究責任者　済生会横浜市東部病院
こどもセンター　総合小児科
こどもセンター長　　岩本　眞理

１．はじめに

新型コロナウイルスでは「エアロゾル」を介して感染するリスクがあることが注意勧告されている[1)2)3)]。重症肺炎では、酸素投与の他、非侵襲的呼吸補助療法としてHFNC・NPPV等の治療法が侵襲の低い有効な治療法として確率されている。これらは気管内挿管・人工呼吸器管理が必要となる前のタイミングで気道浄化や陽圧化による気道確保によって呼吸の改善をきたす。ところが新型コロナウイルス感染では患者のマスクから漏れ出るエアロゾルによる二次感染が危惧され、吸入や非侵襲的呼吸補助療法の使用について複数の学会（日本アレルギー学会・日本小児科学会）から医療従事者への二次感染にたいする注意喚起がなされている。一方感染が蔓延すると、重症患者が増えて人工呼吸器が不足し適切な治療が行えずに多くの命を失うような医療崩壊を招く可能性が指摘されている。

重症者では気管内挿管・人工呼吸器管理が必要となる。さらに新型コロナウイルス感染者の全身麻酔下での緊急手術の場合においても同様で、いずれも挿管時と抜管時の操作中にエアロゾルが発生するため医療従事者の二次感染が危惧されている。

このように呼吸関連の治療の様々な状況で起きる感染リスクを可能な限り減らすことが急務となっている。

２．内容

今回我々は、以下の項目について実験・検討した。

1．小児の喘息・喘息様気管支炎で使用されるネブライザー・インスピロン、および非侵襲的呼吸補助療法で小児・成人ともに気道浄化に有効なHFNCの3種類の治療時に発生するエアロゾル動態の可視化。また救急で用手的なマスクバッグによる換気、および心マッサージ中のエアロゾル動態についても同様に可視化した。

2．簡便なテント＋ファンフィルタユニット（FFU）を作成し、エアロゾル飛散の抑制効果の評価。

実験方法

1．気流・エアロゾルの可視化は暗室にてLED/レーザー光源による動画撮影を行った。（新日本空調（株）に依頼）。5分間の積層画像を作成し、ベクトル解析ソフトにより気流速度分布（Particle Image Velocimetry: PIV）を求め、気流を可視化した。

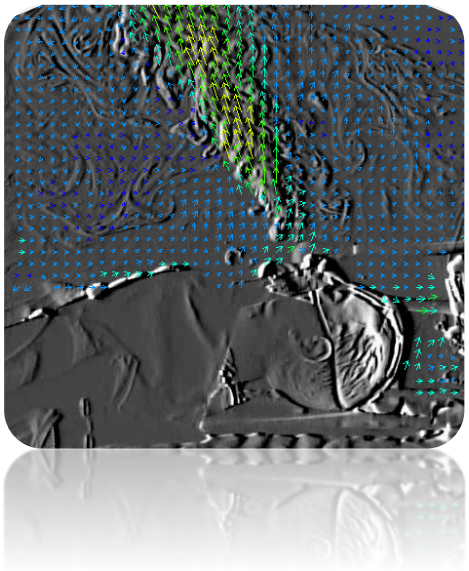
2．テントは縦・横・高さ50cmの塩化ビニルパイプで枠組みを作成し、厚さ0.1mmのビニルで覆って簡易的なテントを作成した。テント内からエアロゾル

を吸引するためのFFTを設置した。FFTはクリーンルーム用吸塵器（オーム電機製ダストキューブ）に HEPA フィルタを装着し、吸引口を患者からのエアロゾルが発生する付近に設置した。

３． 成果

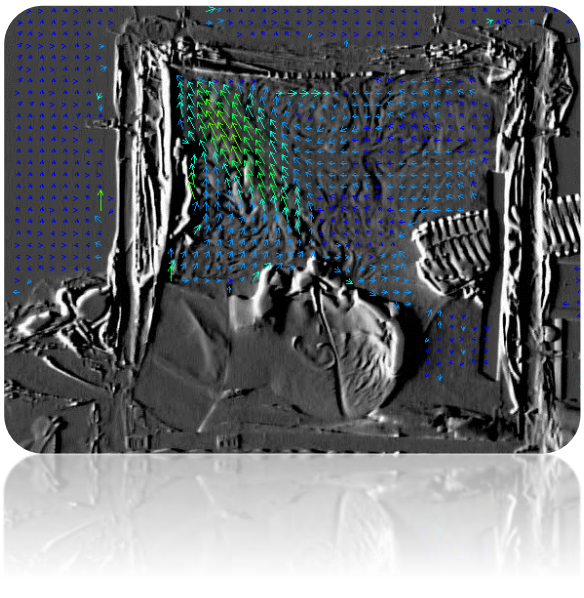
1. ①ネブライザー：初めの 20 秒は頭部後方を主にエアロゾルが拡散した。その後上方から周囲四方に拡散する動態が確認された。
   ②インスピロンネブライザー：初めの 20 秒は頭側後方への拡散が主体であるが、その後上方向から周囲四方に拡散し 30 秒では上半身周囲はエアロゾルが蔓延した。
   ③HFNC: ネブライザーとは異なる気流動態を呈した。開始直後より鼻から前上方向に早い気流が生じ、10 秒後にはその気流から周囲へエアロゾルが拡散し、30 秒の短時間で広い範囲に蔓延した。

図１　HFNC 気流速度分布（PIV）画像



2. ①簡易テント:簡易テント内でのネブライザー・インスピロン・HFNC の施行は、エアロゾルの拡散をある程度抑制することが、確認された。しかし、テント内にエアロゾルが蔓延するとテントの隙間から周囲に漏出した。
   ②ファンフィルタユニットと簡易テントを組み合わせると、ほぼすべてのエアロゾルを回収することが可能であった。
   ただし、エアロゾルを漏出させない有効なテントの大きさは、FFT の性能によって規定された。テントが小さいほど有効であったが、テントを大きくすると性能の高い FFT が必要となった。
   また、気流の方向はエアロゾル回収に重要な要因で、吸引口の対側に適度な大きさの窓を作成することによって、一方向の整流が生じ効率的なエアロゾルの回収が可能となった。

図２　HFNC 施行時中のテント+FFT ユニット併用 PIV 画像：テント+FFT ユニットによってエアロゾル拡散防止が可能となった。



3. これらの結果をふまえて、コロナ禍で制限されていたネブライザー治療を、テントと FFT ユニットによる感染対策を併用しながら、小児科外来で必要時に施行することが可能となった。

4．実験の内容と結果については、第 95 回日本感染症学会（2021 年 5 月）にて 3 題（ネブライザー・インスピロン・HFNC）の発表を行った。

① ネブライザー使用に伴うエアロゾル感染の予防策について：山本嵩

② インスピロンネブライザー使用時の感染予防策：中山彰

③ テントとファンフィルタユニットを組み合わせた装置による HFNC 使用時のエアロゾル拡散の抑制効果についての検討：今野裕章

4．まとめ

ネブライザー・インスピロン・HFNC 等の非侵襲的呼吸療法は、いずれもエアロゾルを発生し短時間で周囲四方に拡散する動態が確認された。簡易テントと FFT を組み合わせることによって、エアロゾル拡散を防止し、二次感染予防が可能であることが確認された。

謝辞

研究の資金にサポートいただいた中谷医工計測技術振興財団に心より御礼申し上げます。

また、実験に最後まで参加・協力してくださった臨床工学の山田紀昭氏、野口恭平氏、小児科今野裕章医師、中山彰医師、山本嵩医師に感謝します。可視化システムの提供とアドバイスをいただいた新日本空調（株）川畑さん、古川さんに感謝いたします。

参考文献および発表論文

1) Kohanski MA, Lo LJ, Waring MS. Review of indoor aerosol generation transport and control in the context of COVID-19. Int Forum Allergy Rhinol. 2020;00:1-7-

2) Doremalem N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and surface stability of SARA-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. N Engl J Med. 2020;16:1564-1567

3) Meselson M. Droplets and Aerosols in the transmission of SARS-CoV-2. N Engl J Med. 2020;21:2063

★第 95 回日本感染症学会で発表した 3 研究については論文化の準備中である。

循環血小板の大規模シングルセルイメージングによる COVID-19 関連微小血管血栓症研究

研究責任者　東京大学　大学院理学系化学専攻
教　授　　合田　圭介

１．はじめに

COVID-19 の世界的大流行以来、症例数の増加に伴って、COVID-19 に関連した微小血管血栓症が COVID-19 の重症度と死亡率に関連する主要な要因の一つであることが明らかになってきている。実際に、COVID-19 で死亡した患者の初期の剖検報告では、肺、心臓、その他の臓器の末梢毛細血管や細動脈内に存在する広範な弥漫性の微小血栓を特徴とする血栓性微小血管症（TMA）が認められ、多臓器不全に陥っていたことが確認されている。これは、COVID-19 の主な死因が重度の弥漫性の肺胞損傷による呼吸不全であったことに合致する。さらに、SARS-CoV-2 の宿主細胞への侵入が、アンジオテンシン変換酵素 2（ACE2）受容体を介することで、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系を刺激し、血管内皮の損傷に続いて血管炎（血管の炎症）を引き起こし、微小血栓を形成するという、COVID-19 の病態生理の理解とも一致している。また、COVID-19 患者において、ヘパリンを用いた抗凝固療法が予後の改善につながるとの報告が相次いだことを受けて、国内外の機関から、明確な血栓性合併症の症状がなくても、入院中の COVID-19 患者全員にヘパリン投与血栓予防を行うことを推奨する臨床診療ガイドラインが発行され、その有効性が理解されている。

残念ながら、COVID-19 に関連した微小血管血栓症の発生の根本的なプロセスはまだ解明されていない。これは、血小板の活性、具体的には血栓形成の開始時に起きる血小板凝集の詳細な特徴を in vivo で統計的に調べるツールがないためである。例えば、光学顕微鏡は、高い空間分解能で血小板凝集を直接調べることができ、実際、COVID-19 において、マクロトロンボサイトを含む血小板凝集体の存在を確認することで、血小板の活性亢進が可視化されている。しかし、光学顕微鏡による目視検査では、血小板凝集体を大規模かつ統計的に有意な方法で解析するには時間と労力が必要となる。一方、フローサイトメトリーは、フロー中のインピーダンス測定、散乱測定、蛍光測定などにより細胞の物理的・化学的特性を測定することで、大規模な細胞集団を統計的に解析することが可能であり、COVID-19 では蛍光プローブを用いて白血球の亢進を確認している。しかし、フローサイトメトリーでは十分な空間分解能を得ることが難しく、単一の血小板と血小板凝集体を正確に区別することができず、したがって血小板の活性を正確に評価することは困難とされてきた。また、光透過凝集計は、臨床検査で広く使用されているが、この方法は、in vitro で多数の血小板の平均的なアゴニスト誘発凝集特性をアンサンブル測定により評価するものであり、血小板のサイズ分布や単一／凝集体の比率など、血小板凝集の詳細を知ることはできない。さらに、血栓症の診断法として広く用いられている D-ダイマー検査は、従来、血栓が線溶により分解される際に生じる架橋されたフィブリンモノマー（D-ダイマーと呼ばれる）を測定することにより、血栓の存在を推定するために用いられている。D-ダイ

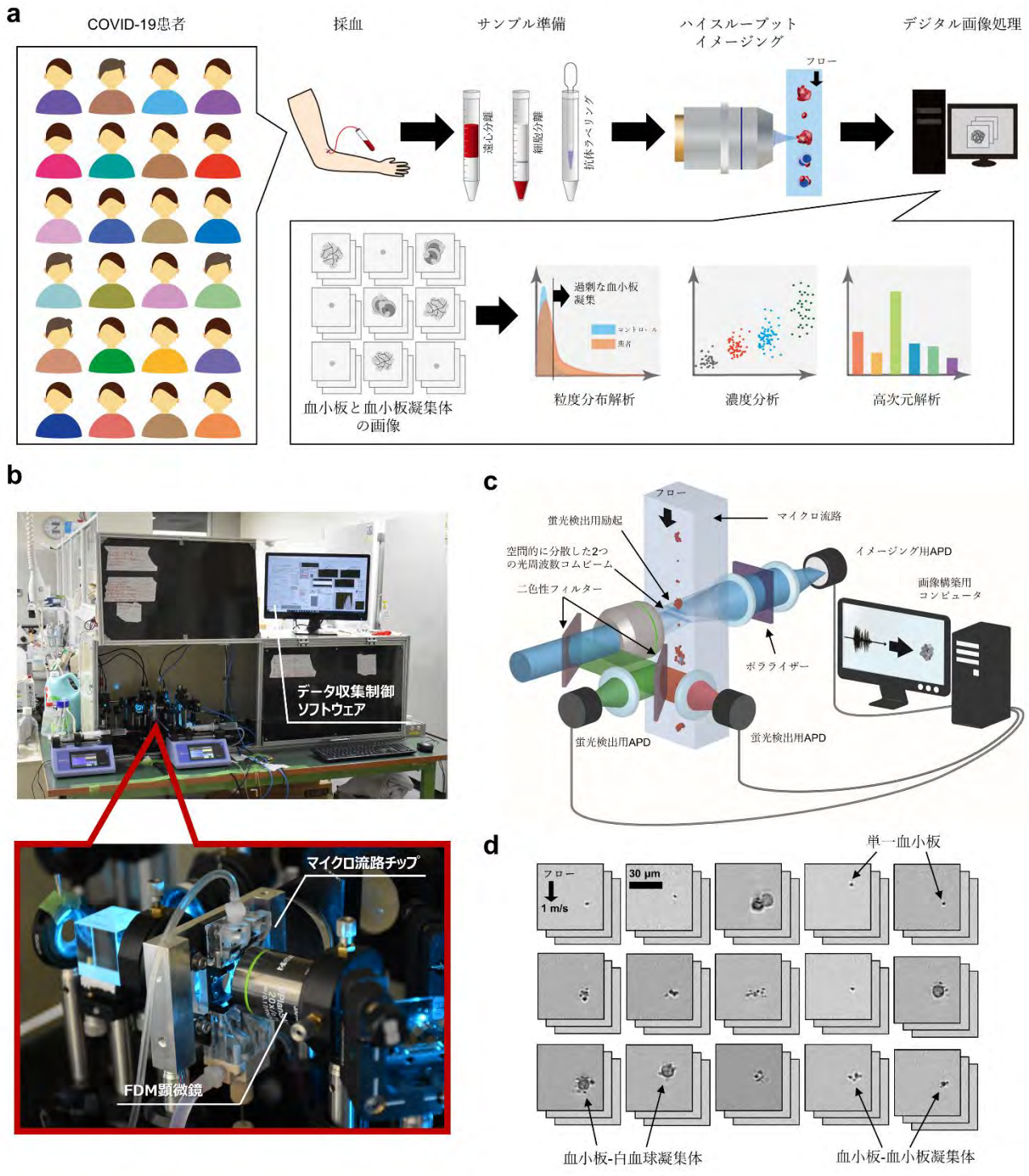


図 1　循環血小板および血小板凝集体の単一細胞分解能での大規模画像ベースのプロファイリング

a, 採血、サンプル調製、ハイスループット画像処理、デジタル画像解析からなる実験ワークフロー **b,** 東京大学医学部附属病院臨床検査部に設置されたマイクロ流体チップ上の FDM 顕微鏡の写真。**c,** ハイスループットでブレのない明視野画像を得るための FDM 顕微鏡の概略図。**d,** FDM 顕微鏡で得られた単一血小板および血小板凝集体の典型的な明視野画像。

マー検査によって、入院時の D-ダイマー濃度の上昇（1 μg/mL 以上）が確認されると、人工肺の必要性および合併症による死亡のリスクがともに高まることから、COVID-19 の重症度評価に有用であると報告されている。しかし、D-ダイマー検査は生体内の血小板活性を調べるものではなく、重

症化しない限りは、TMA などの微小血管の血栓症に対しては感度が低い。コンピュータ断層撮影（CT）、磁気共鳴画像（MRI）、超音波検査などの医用イメージングは、体内の血栓を直接識別する

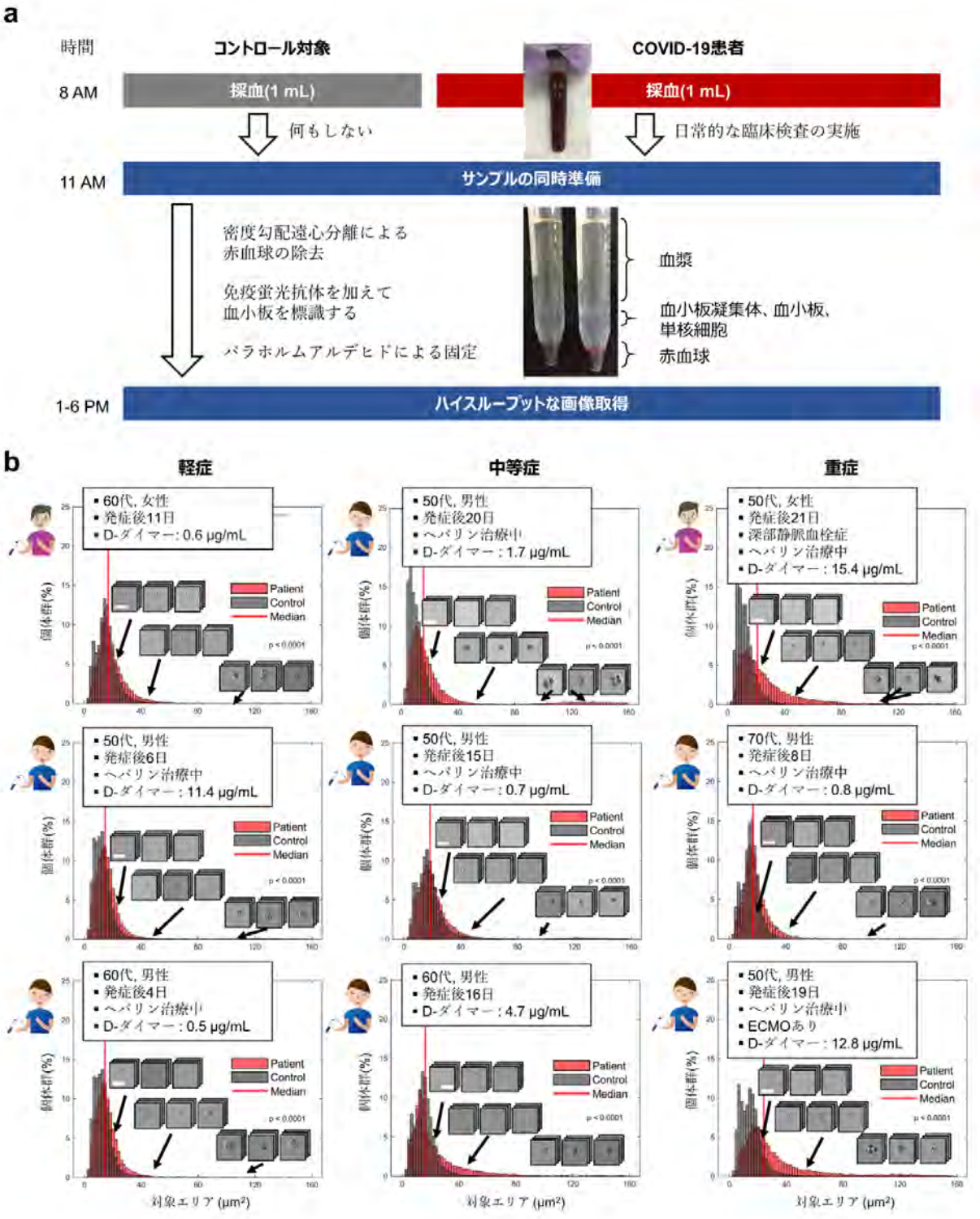


図 2　COVID-19 患者の血液中の血小板凝集体

a, サンプル調製プロトコル。採血、サンプル調製、光学的アライメント、流体力学的集束条件などの実験的な差異に起因する画像データの潜在的なバイアスを軽減するために、同じ日に同じサンプル調製および画像取得条件でコントロールデータを得た。**b**, COVID-19 の軽症、中等症、重症患者の血液中の単一血小板および血小板凝集体のサイズ分布ヒストグラムと典型的な画像。各患者の臨床情報および D-ダイマー値も挿入図に示した。参考資料としてコントロールデータも示した。

ことができるが、循環している血小板凝集体や微小血栓を認識するのに十分な空間分解能を持っていない。死後の検査では、微小血栓を直接識別することができるが、死んだ患者にしか適用できない。実際には、血小板凝集を詳細に調べる方法として、多くの情報を得られる光学顕微鏡が主に用いられてきたが、先に述べた通り大規模な解析には向かないため、血小板凝集の形態に関する統計的な理解は進んでおらず、その重要性が看過されてきた。

本研究では、COVID-19 における微小血栓形成の一過性のプロセスをよりよく理解するために、COVID-19 患者の血液サンプルを大量の単一細胞画像ベースでプロファイリングし、時間的にモニタリングすることで、循環血小板凝集体に関する知見を得ることに成功した。図 1a に示すように、我々のデータ駆動型の解析方法は、(i)COVID-19 患者からの採血（1mL）、(ii)血液から血小板および血小板凝集体を分離するサンプル調製、(iii)血液サンプル中の単一血小板および血小板凝集体（血小板-血小板凝集体および血小板-白血球凝集体を含む）の大規模な集団（n = 25,000）を、流体力学的集束マイクロ流体チップ上で光学的周波数分割多重化（FDM）顕微鏡による高スループットでブレのない明視野イメージング、(iv)デジタル画像処理、および統計的血小板凝集分析のための様々な技術の適用、によって構成される。入院患者の血液中に含まれる血小板凝集体の集団およびそのサイズ分布の経時変化を観察するために、入院患者 1 人あたり週 3〜5 回の頻度で画像取得を行った。図 1d は、53.6μm×53.6μm の視野、0.8μm の空間分解能で取得した、1m/s の高速で流れる単一血小板および血小板凝集体の典型的な明視野画像（67×67 ピクセル/画像）である。図に示すように、我々の手法では、単一血小板、血小板-血小板凝集体、血小板-白血球凝集体、およびその他の成分（残留赤血球、白血球、細胞破片など）を直接画像化して識別することができるため、従来のフローサイトメトリーよりもはるかに高い精度で、特に、単一血小板と微小な血小板凝集体を区別することが可能である。重要なのは、この血小板凝集体の大規模な画像データベースによって、これまで不可能だった高度な計算ツールの適用が可能になり、ここで示したように、ユニークで洞察に満ちた分析結果が得られることである。我々の知る限り、COVID-19 に限らず、あらゆる疾患において、このような統計的に大規模な循環血小板凝集体の画像ベースのプロファイリングと分析を行ったのは、これが初めての報告である。

２．結果

画像取得とサイズ分布

我々は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）検査の結果に基づいて COVID-19 と臨床診断された入院患者（n = 110）の血液中の単一血小板および血小板凝集体の明視野画像を各サンプルにつき 25,000 枚取得した（図 2a）。また、ネガティブコントロール画像データは、健康な被験者から同じ日に同じサンプル調製および画像取得条件で取得した。これは、採血、サンプル調製、光学的アライメント、流体力学的集束条件などの実験的変動に起因する画像データの潜在的なバイアスを軽減するためであり、したがって、in vitro での凝集の影響を最小限に抑えつつ、in vivo での血小板凝集の状態を維持するためである。画像取得は、100 - 300 events per second (eps)の高スループットで行われた。ここで、イベントとは、単一血小板または血小板凝集体と定義される。赤血球、白血球（ただし、血小板-白血球の凝集体に含まれるものを除く）、細胞破片などの残留成分はイベントとして検出されなかった。スループットは、マイクロ流体チップのマイクロ流路が詰まらないように選択されたが、FDM 顕微鏡の理論上のスループットは 10,000 eps 以上であった。

図 2b に示すのは、COVID-19 患者の血液中に同定された単一血小板および血小板凝集体のサイズ分布ヒストグラムと典型的な画像である。各患者の臨床情報および D-ダイマー濃度を挿入図に示した。また、ネガティブコントロールのデータ

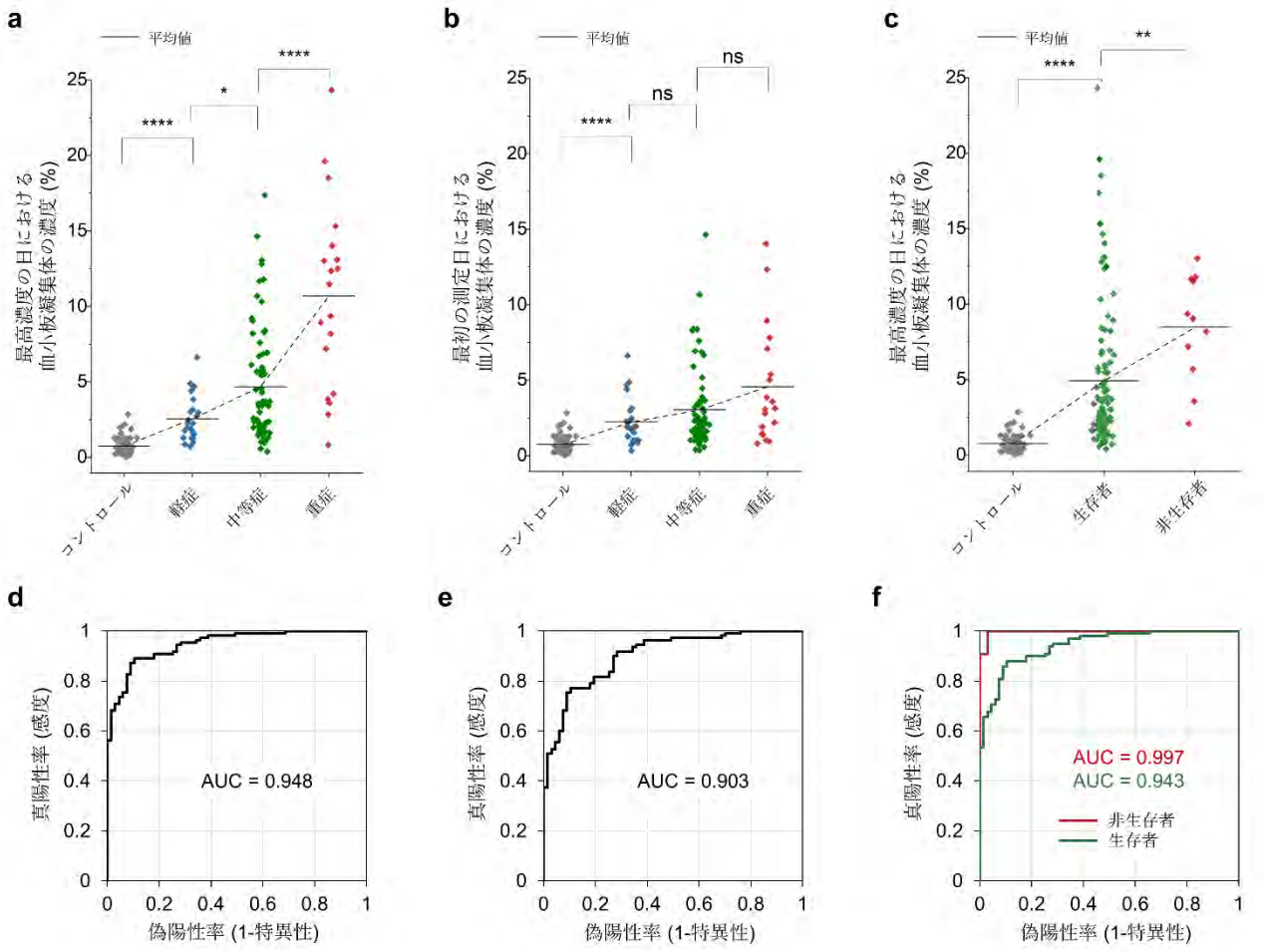


図 3 COVID-19 の重症度・死亡率との比較

ns：p＞0.05、*：p≦0.05、**：p≦0.01、***：p≦0.001、****：p≦0.0001。 **a,** COVID-19 の軽症患者（n＝23）、中等症患者（n＝68）、重症患者（n＝19）の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。血小板凝集体を含む画像の定義については、詳細は「結果」の「統計分析」を参照。 **b,** 各入院患者の最初の測定日における、COVID-19 を使用した軽症（n = 23）、中等症（n = 68）、および重症（n = 19）の血小板凝集体濃度の比較。**c,** COVID-19 の生存者（n = 99）と非生存者（n = 11）の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。 **d, e, f,** それぞれ図 3a, 図 3b, 図 3c に示したデータの ROC 曲線。

も参考として図中に示した。横軸の対象エリアは、各画像内で検出された単一血小板または単一の血小板凝集体の面積を指す。COVID-19 の患者は、酸素療法を必要としない軽症患者、酸素療法を必要とする中等症患者、人工肺や体外式膜酸素療法による呼吸補助を必要とする重症患者の 3 つのグループに分類された。この分類には、各患者の入院中の最高重症度を参照した。図 2b に示すように、D-ダイマー濃度が低い（1μg/mL 以下）患者の血液中にも過剰な血小板凝集体が存在していたことから、COVID-19 によって血小板活性が増強されていることが確認された。また、これらは微小血栓が形成され分解されることで確認される、臨床的に明らかな血栓症以前のものであることが示唆された。

統計分析

続いて、血小板凝集体の大規模な画像データを統計的に解析し、傾向や相関関係を可視化した。図 3a は、軽症、中等症、重症の COVID-19 患者の血小板凝集体の濃度を、各入院患者の最高濃度の日に測定されたものを比較したものである。血小

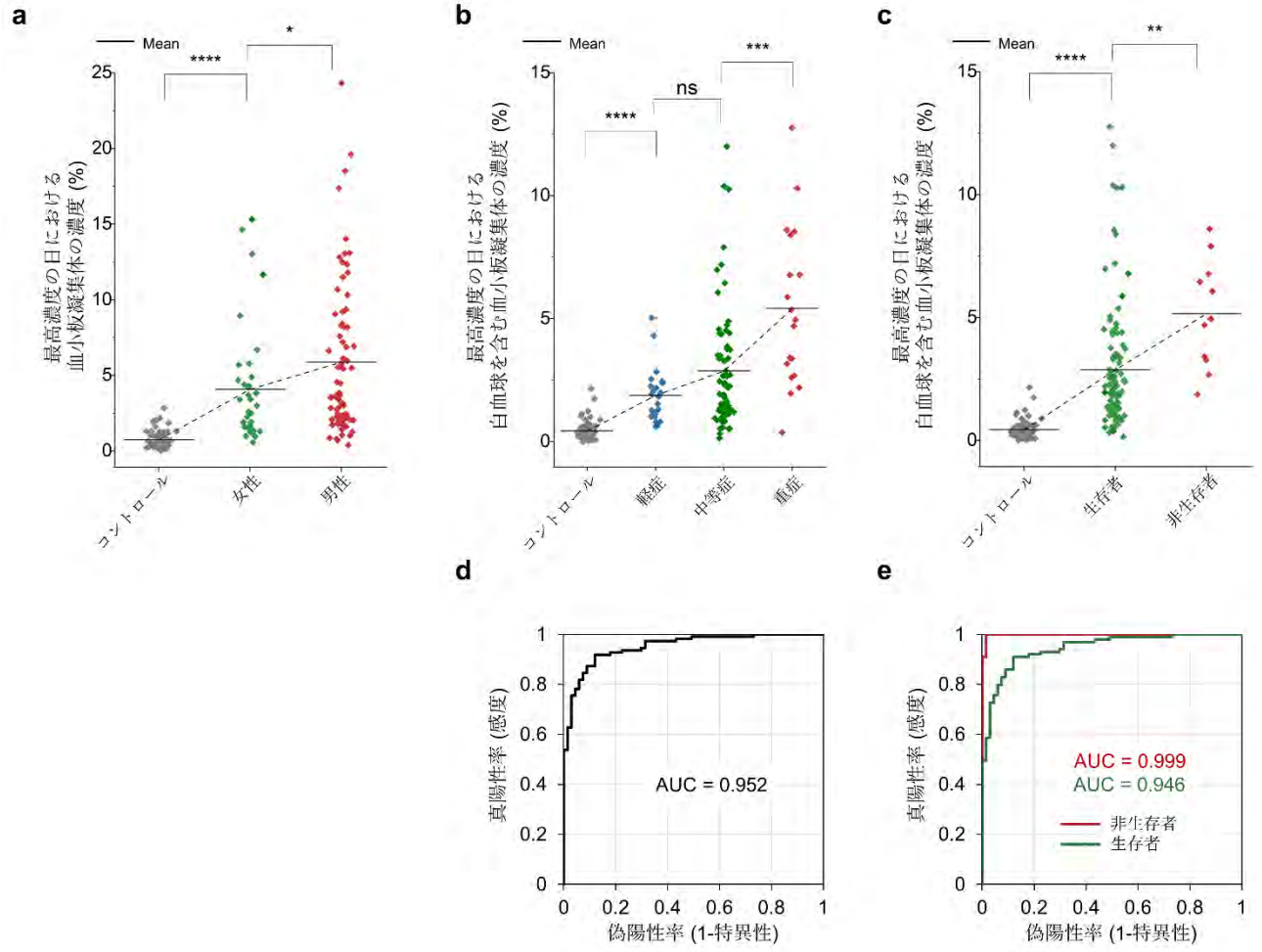


図 4 性差と白血球の影響

ns：p＞0.05；*：p≦0.05；：p≦0.01；***：p≦0.001；****：p≦0.0001。a，男性（n＝73）と女性（n＝37）の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。b，白血球を含む COVID-19 を用いた軽症（n＝23）、中等症（n＝68）、重症（n＝19）の患者の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。c，COVID-19 の生存者（n = 99）と非生存者（n = 11）の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。d，e，図 4b および図 4c に示したデータの ROC 曲線。**

板凝集体の濃度は、各サンプルの総取得画像数（n = 25,000）に対する血小板凝集体を含む取得画像数の比率で定義した。ネガティブコントロールの結果（図 3a、図 3b、図 3c では「コントロール」と表示）は、67 の異なる日付の、健康な被験者（n＝4）の血液サンプルから得たものである。興味深いことに、この図では、COVID-19 患者全体の 87.3%もの人に過剰な血小板凝集が見られたという異常な状態が示されている。この中には、東京大学医学部附属病院における D-ダイマー値の基準値である 1 μg/mL 以下であった患者も含まれている。個々のサンプルで確認された過剰な血小板凝集は、血小板機能検査や遺伝子発現解析で検出された平均的な血小板の過活性に関するこれまでの報告と一致している。また、この図は、患者の重症度と血小板凝集体の濃度に強い関連性があることを示している。さらに、最初の測定日（図 3b）と最も濃度の高い日（図 3a）（通常、最初の測定日から約 1 週間後）の間で血小板凝集体の濃度が上昇していることが示されており、初期症状が現れてから約 1 週間後に症状が悪化した COVID-19 患者に関するこれまでの報告と一致している。同様に、図 3c は、患者の死亡率と血小板凝集体の濃度との間に強い相関関係があることを示している。図 3d、図 3e、図 3f は、それぞれ図 3a、図 3b、図 3c に示したデータに対応する、コントロール

に対する血小板凝集体の濃度の ROC（Receiver Operating Characteristic）曲線を示している。各 ROC 曲線の曲線下面積（AUC）の値が大きいことから、COVID-19 関連の血小板活性を評価する上で、血小板凝集体の濃度が優れたマーカーとなりうることが示された。

さらに、これらの結果について、性差や白血球の有無による影響を調べた。具体的には、図 4a は、統計的有意性はあまり高くないものの、男性患者（n＝73）の方が女性患者（n＝37）よりも血小板凝集体の濃度が高いことを示しており、これは、男性患者は女性患者よりも集中治療室への入室や死亡の傾向が強いという以前の報告と一致している。さらに、本手法では、血小板凝集体を高解像度で捉え、その画像に形態解析を施すことで、白血球の存在を確認することができた。図 4b および図 4c は、血小板凝集体中の白血球の存在が、それぞれ COVID-19 の重症度および死亡率と関連していることを示しており、これは COVID-19 における白血球の亢進に関するこれまでの報告とも一致する。 図 4d および図 4e は、それぞれ図 4b および図 4c に示したデータに対応する、対照に対する血小板凝集体の濃度の ROC 曲線である。これらの ROC 曲線の AUC は、COVID-19 に関連した血小板-白血球活性を評価する上で、白血球を含む血小板凝集体の濃度が優れたマーカーとなりうることを示している。

臨床検査値および身体所見との比較

次に、循環血小板凝集体の大勢を、従来の臨床検査・身体所見の結果と比較した。図 5a に示すように、白血球数（WBC）、D-ダイマー値、凝固第 VIII 因子活性値（FVIII）、von Willebrand 因子活性値（VWF:RCo）、トロンボモジュリン値（TM）、酸素投与重症度（respiratory severity）は、いずれもスピアマンの順位相関係数が 0.4 以上であることから、最高濃度の日に測定した血小板凝集体濃度と統計的な関連性があることがわかった。赤血球数（RBC）、C 反応性タンパク質濃度（CRP）、フィブリノーゲン濃度（Fbg）、クレアチニン濃度（Cre）、体温などの他のパラメータは、相関性が弱いか、有意な関係が見られなかった。また、血小板凝集体濃度と SpO2（酸素飽和度）レベルとの相関は、SpO2 レベルを良好に保つために必要な酸素投与が行われた患者の病状を反映していることから、妥当なものであると言える。このような血小板凝集体濃度と WBC、FVIII、VWF:RCo、TM 濃度との強い相関関係は、全身の血栓形成や線溶現象、血管内皮障害（血管炎）を血小板凝集体の濃度が反映していることを示している。これらの関連性は、COVID-19 患者の肺における深刻な血管内皮障害と肺胞毛細血管における広範な微小血栓に関する以前の報告と一致している。

血小板凝集体の濃度の有意な説明をさらに検討するため、多変量回帰分析（SPSS ソフト、IBM）を、血管内皮障害マーカー群（FVIII、TM、VWF: RCo）、凝固・線溶マーカー群（D-ダイマー、FDP、TAT、PT-INR）、最高濃度日の血小板凝集体濃度と強い相関を持つ他のマーカー群（WBC、呼吸重症度、PLT、LD、ALT、SpO2、生存率、性別）を独立変数として多変量回帰分析を行った。その結果、FVIII、PLT、WBC、PT-INR、呼吸器重症度が、最高濃度日の血小板凝集体濃度の有意な予測因子として同定された。これらのパラメータを用いてさらに多変量回帰分析を行ったところ、最高濃度日の血小板凝集体濃度の最も有意な予測因子として、呼吸器系の重症度（p＝0.009）と FVIII（p＝0.016）が同定された。

次に、D-ダイマー濃度が低いにも関わらず COVID-19 関連の血栓症が発症したという先行研究と比較するため、COVID-19 患者全体の 39.1%を占める D-ダイマー濃度が基準値の 1 μg/mL 以下の症例（n = 43）を調査した。図 5b に示すように、これらの症例において、有意に高い血小板凝集体濃度が確認された。また、図 5c に示すように、図 3a に示した関係と同様に、患者の重症度と血小板凝集体濃度の相関関係も見られた。軽症患者と中等症患者に有意な差は見られなかったものの、いずれも患者が ECMO による治療を行っていないなど、臨床的状態が類似していることから

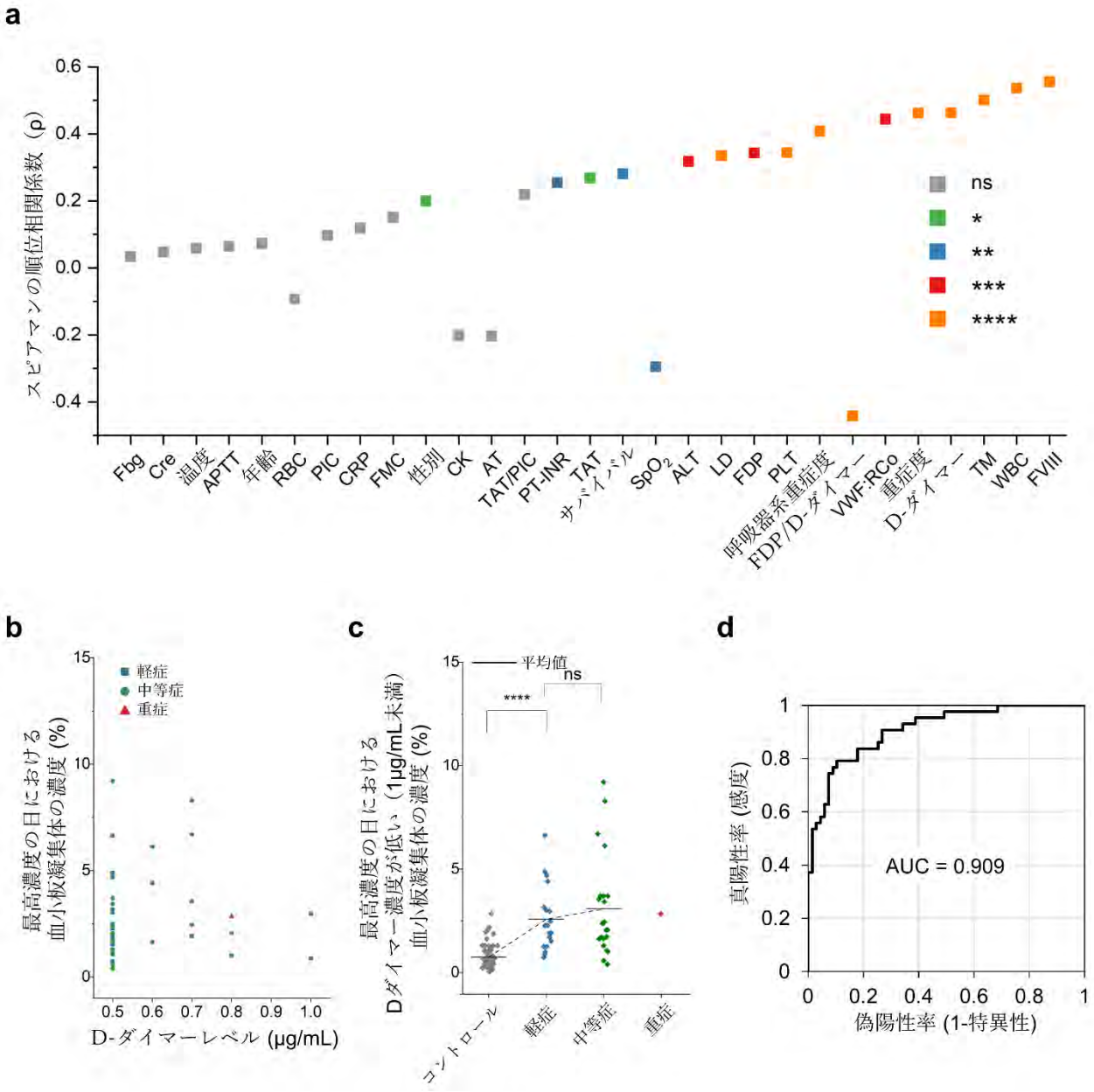


図 5 臨床検査値との比較

a, 最高濃度の日に測定した血小板凝集体濃度と臨床検査値および身体所見との比較。WBC：白血球数、RBC：赤血球数、PLT：血小板数、APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間、PIC：血漿プラスミン-α2-プラスミンインヒビター複合体、CRP：C 反応性タンパク濃度、FMC：フィブリンモノマー複合体、CK：クレアチニンキナーゼ、AT：アンチトロンビン、PT-INR：プロトロンビン時間国際標準化比、TAT: トロンビン・アンチトロンビン複合体、SpO2：酸素飽和度、ALT：アラニントランスアミナーゼ濃度、LD：乳酸脱水素酵素濃度、FDP：フィブリノーゲン／フィブリン分解産物、VWF:RCo：フォン・ヴィレブランド因子活性、TM:トロンボモジュリン、FVIII:凝固第 VIII 因子活性、Temperature:体温。**b,** COVID-19 患者で D-ダイマー値が低い（≦1μg/mL）患者（n=43）の血小板凝集体濃度。 **c,** COVID-19 患者で D-ダイマー値が低い（≦1μg/mL）軽症（n=17）、中等症（n=22）、重症（n=1）の血小板凝集体濃度の比較（各入院患者の最高濃度で比較）。ns: $p > 0.05$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; ****: $p \leq 0.0001$. **d,** 図 5c に示したデータの ROC 曲線。

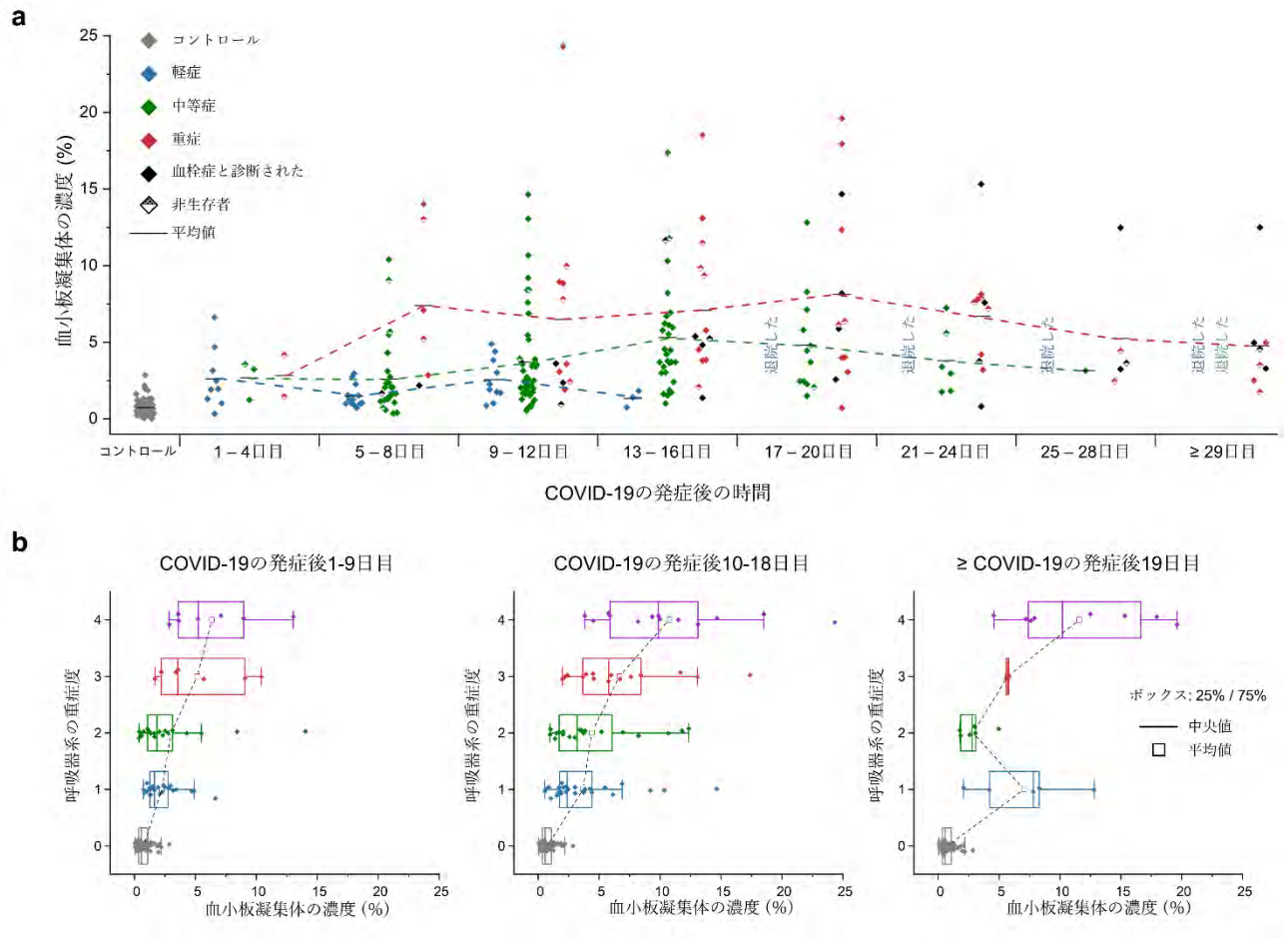


図 6 時間的モニタリング

a, 重症度別（軽症、中等症、重症）の血小板凝集体濃度の推移。各患者の入院中の最高重症度を重症度分類に用い、各患者群の血小板凝集体濃度の推移を追跡した。 b, 呼吸器系の重症度と血小板凝集体濃度の比較。レベル 0：コントロール、レベル 1：酸素投与なし、レベル 2：0.5～4L/min の酸素投与あり、レベル 3：5L/min 以上の酸素投与あり、レベル 4：人工肺または ECMO あり。

この結果は妥当と言える。また、この図では、D-ダイマー値が 1μg/mL 以下の患者の 76.7%もの患者に過剰な血小板凝集体が認められた。これらの結果は、D-ダイマー検査では検出できなかった、無視できない微小血管血栓症リスクの存在を示唆していると考えられる。D-ダイマー検査は、主に血栓形成の最終段階である架橋、または血栓分解後に生成される D-ダイマーの濃度を測定することで血液凝固を評価するものであり、TMA を含む微小血管血栓症に対しては感度が高くないことが知られている。一方で、我々の方法は、微小血栓形成の開始と微小血栓の分解を特徴づけるものである。したがって、後者の方法は、広範囲に及ぶ微小血栓形成のメカニズムとして示唆されている血小板の過活性に対して、高解像度でより高感度で反応する。また、図 5c に示したように D-ダイマー値が低い重症例が 1 例しか確認されなかったのは、D-ダイマー検査は前述のように一般的には TMA に対しての感度は低いが、患者の病状が重篤化した場合には検出可能であるためと説明できる。つまり、図 5a の D-ダイマー値と血小板凝集体濃度の相関関係は、中程度の重症の場合には有意であるが、軽度・中程度の場合には有意ではない。最後に、図 5d に D-ダイマー値が 1μg/mL 以下の低濃度の血小板凝集体濃度の ROC 曲線を示した。AUC 値がコントロールに対して大きいことから、D-ダイマー値が低い場合においても、COVID-19 の重症度を評価する本手法の性能が

優れていることが示されている。

時間的モニタリング

最後に、COVID-19 患者の血中の血小板凝集体濃度を時間的にモニタリングすることで、COVID-19 患者の病態を調査した。このうち、患者のほとんどがヘパリンによる抗凝固療法を受けていた。図 6a は、COVID-19 発症後の各患者群(軽症、中等症、重症）の血小板凝集体濃度の推移を示したものである。前述のように、重症度分類には、各患者の入院中の最高重症度を用いた。具体的には、図に示すように、軽症患者群の血小板凝集体濃度は、最初の 9〜12 日目にピーク（約 2.5%）を迎え、その後 1 週間かけて徐々に低下し、16 日目には軽症患者全員が退院した。同様に、中等症患者群の血小板凝集素濃度は、最初の 13〜16 日後にピーク（約 5%）を迎え、その後 2 週間かけて徐々に減少し、28 日後には中等症患者全員が退院した。一方、重症患者群の血小板凝集体濃度は、最初の 1 週間でピーク（約 7%）に達した後、3 週間にわたってプラトー状態を示し、その後、死亡または慢性期病院への転院となった。ここで重要なことは、どの患者群もはじめの 3〜4 日は血小板凝集体濃度が中程度（約 2.5%）であったが、続く 3〜4 日で濃度に変化が見られ、患者群ごとに異なる予後パターンを経る一方で、退院のタイミングはすべての予後パターンで血小板凝集体濃度が低下するという点で一致していることである。また、図に示すように、血栓症を発症した患者は、軽症・中等症の患者や一部の重症の患者よりも長い期間入院していた。さらに、図 6b に示すように、1〜9 日目、および 10〜18 日目の呼吸器重症度と血小板凝集体濃度との間に強い相関関係があることから、血小板凝集体濃度が COVID-19 患者の呼吸器の状態を示す良い指標であることを示唆している。COVID-19 発症後 19 日目以降の患者の血小板凝集体濃度の双峰型分布は、酸素投与が必要となるレベル 2 および 3 の患者が、酸素投与が不要となるレベル 1 にステップダウンして退院したことや、人口肺や ECMO が必要となるレベル 4 の患者が入院したままであったことを反映している。

３．考察

COVID-19 患者の血液中の循環血小板および血小板凝集体の大規模な画像ベースのプロファイリング、時間的モニタリング、および大規模データの解析を組み合わせることで、COVID-19 に関連する微小血管血栓症の根本的なプロセスについて新たな知見が得られた。具体的には、血小板凝集体の濃度と COVID-19 の重症度および死亡率との間に強い関連性があることが示された。さらに、血小板凝集体の濃度と VWF:RCo、FVIII、TM レベルで特徴づけられる内皮活性化との正の相関関係（図 5a）は、ウイルスの宿主細胞への侵入が ACE2 受容体を介することで血管内皮に損傷を与え、内皮血管機能障害や血管炎（血管の炎症）を引き起こすという COVID-19 の病態生理学的メカニズムについて、現在広く受け入れられている理論と一致している。VWF は血管内皮傷害部位での血小板の接着・凝集を仲介する因子であるため、炎症を介した血管内皮傷害時には大量に血中に放出される。特に図 3a、図 5a に示したように、COVID-19 の重症度と関連のある血小板凝集体濃度の上昇を直接観察することで、VWF レベルと COVID-19 の重症度との相関に関するこれまでの報告の妥当性が実証された。さらに、図 3a〜図 3c 示した結果は、最近になって提唱された COVID-19 の発症時に血小板が過敏に反応するというメカニズムを裏付けている。このメカニズムは、血管炎だけでなく、SARS-CoV-2 と血小板との直接的な相互作用を介したもので、今回の研究で COVID-19 患者の約 90%に見られた過剰な血小板凝集体の異常な存在を説明するものと思われる。また、重症の COVID-19 患者では、肺が血小板活性化の起こる主要な部位であり、広範囲に微小血栓が発生するという以前の報告と合わせて、肺における血小板と内皮細胞の同時活性化が COVID-19 患者の呼吸状態の悪化に密接に関与している可能性があり、重症の COVID-19 患者の動脈酸素化と臨床転

帰の改善に抗血小板療法が有効であると予測される。

今回の結果から、死後の検査でしか確認できなかった微小血栓形成の潜在的なリスクを評価するためには、循環血小板凝集体の濃度と分布を測定することが有効な手段となり得ることが示唆された。実際に、COVID-19 肺炎で死亡した患者の主な死因が、微小血栓による重度の毛細血管の鬱血を伴う弥漫性肺胞損傷による呼吸不全であったことを示す剖検報告が多数存在する。また、血小板凝集体の濃度と酸素投与の重症度および SpO2 値との間に強い相関関係があることから（図 5a，図 6a，図 6b）、我々の方法が広範囲の微小血栓形成を早期に検出できることが示唆された。また、図 3a および図 3c に示したように、血栓症と診断されなかった COVID-19 患者の血管内で、CT や MRI などの医療イメージングでは検出されなかった微小血栓を形成が、我々の手法によって確認された。実際、COVID-19 関連血栓症のメタアナリシスでは、スクリーニング検査の実施の有無によって、静脈血栓塞栓症の発生率が大きく異なることが報告されている。我々の臨床診断では、血栓症の発症が見逃されていた可能性があり、図 6a に示したように、重症の場合に必ずしも血栓症の発症が確認されなかったであると考えられる。さらに、図 5c は、COVID-19 関連微小血管血栓症における微小血栓形成の潜在的な前駆体としての血小板活性に対して、我々の手法が高感度であったことを示しており、また、D-ダイマー検査が、患者の病状の重症度が高くない場合、感度が低くなることを示唆している。血小板凝集体の濃度と微小血管血栓症のリスクとの関連性を直接検証するには、例えば、我々の方法と剖検の結果を比較するなど、さらなる研究が必要である。

COVID-19 患者のうち、12.7 %の患者において、過剰な血小板凝集体が見られなかった理由として、二つの要因が考えられる。第一に、軽症および中等症の患者の測定頻度が重症の患者に比べて非常に低かったため、軽症および中等症の患者の血小板凝集体の濃度の最大値を見積もる精度が低かったことが挙げられる。実際、患者 1 人当たりの平均測定回数は、1.9 回（軽症）、2.6 回（中等症）、7.3 回（重症）であった。最初の測定日の血小板凝集体濃度の ROC 曲線の AUC が 0.9 と大きいこと（図 3e）は、一回の測定にもかかわらず、本法の感度と特異性がともに高いことを示している。一方で、測定頻度の低さが、測定された血小板凝集体の濃度の低下につながっていることも意味している。第二に、COVID-19 の患者のほぼ全員がヘパリン系抗凝固剤治療を受けていたため、血小板凝集体の濃度が全体的に低下したと考えられる。したがって、抗凝固剤治療の影響を受けないような動物モデルなどを利用し、より頻繁に測定することで、COVID-19 患者の様々な重症度を評価する際の画像ベースの血小板凝集素プロファイリングの時間的分解能が向上し、したがって、図 3a、図 3c、図 4a、図 4b、図 4c、図 5b、図 5c のプロット、傾向、および相関の精度が向上することが予想される。

この研究の制約および、それらに対する解決策として以下のようなものが挙げられる。まず、本研究の対象者はすべて東京大学医学部附属病院の入院患者であるため、選択バイアスが生じた可能性がある。より一般的な結論を導き出すためには、さらに複数の病院での研究が必要である。第二に、今回の解析は遡及的な観察研究であるため、血小板凝集体濃度が呼吸状態の悪化や微小血栓の発生を予測できるかどうかについては、さらなるプロスペクティブな研究が必要である。以上のように、本研究の手法は、呼吸不全を早期に予測し、人工肺管理への移行を防ぐための治療戦略を立てる上で有望であると考えられる。

謝辞

本研究は、中谷医工計測技術振興財団研究助成の支援を受けて行われました。サンプル調製にご協力いただいた Kyoko Hasegawa 氏と Yoshika Kusumoto 氏に感謝いたします。

発表論文

1) Zhou, Y. et al. The landscape of circulating platelet aggregates in COVID-19. *medRxiv* 2021.04.29.21256354 (2021).

2) Zhou, Y. et al. Intelligent platelet morphometry. *Trends Biotechnol.* https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.12.012 (2021).

3) Pablo, J. et al. High-throughput Raman flow cytometry and beyond. *Acc. Chem. Res.* 54, 2132 (2021).

新型コロナウイルスに対する簡便・迅速な 磁気揺動核酸抽出装置・試薬キットの開発

研究責任者　信州大学医学部保健学科
検査技術科学専攻
教　授　　松田　和之

１．はじめに

新型コロナウイルスによる感染や感染症の診断において PCR を主とした遺伝子検査が最初に確立された。PCR 検査は、従来、ほぼ全ての工程でマニュアル操作を必要とする検査であり、時間と費用がかかる検査として認識されていた。近年、核酸抽出や増幅など各ステップの自動化が進んでいた。PCR 反応液に阻害物質の影響を抑制する特殊な試薬を加え抽出処理を不要とする PCR 試薬もあるが、さまざまな性状の検体を扱う実臨床において偽陰性等が生じていることから、精製度の高い核酸を得るための核酸抽出処理は PCR 検査に必須の前処理工程であるといえる。特別な装置を用いるのではなく、患者から得た検体を無菌的に核酸抽出処理できる簡便な装置および試薬キットさえあれば、病院やクリニックでも PCR 検査が即実施可能な体制を整備できる。

本研究を通した最終的な目的は、申請者らが開発した核酸抽出法である磁気揺動機構 [1]を応用し、熟練者でなくても短時間で核酸抽出が可能な簡便な装置および試薬キットの開発である。さらに、それらを一体化した PCR 検査装置の開発である。

２．内容

本研究では以下の検討項目を実施した。

①磁気揺動核酸抽出装置の開発
②揺動機構によるゲノム DNA 抽出
③揺動システムにより抽出したゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR

３．成果

①磁気揺動核酸抽出装置の開発

核酸抽出ユニットと PCR ユニットを一体化した自動遺伝子検査装置（図１A）の開発（野村メディカルデバイス株式会社との共同開発）を行った。本装置は、正面右側に抽出ユニット、左側に PCR ユニットを装備している（図１B）。

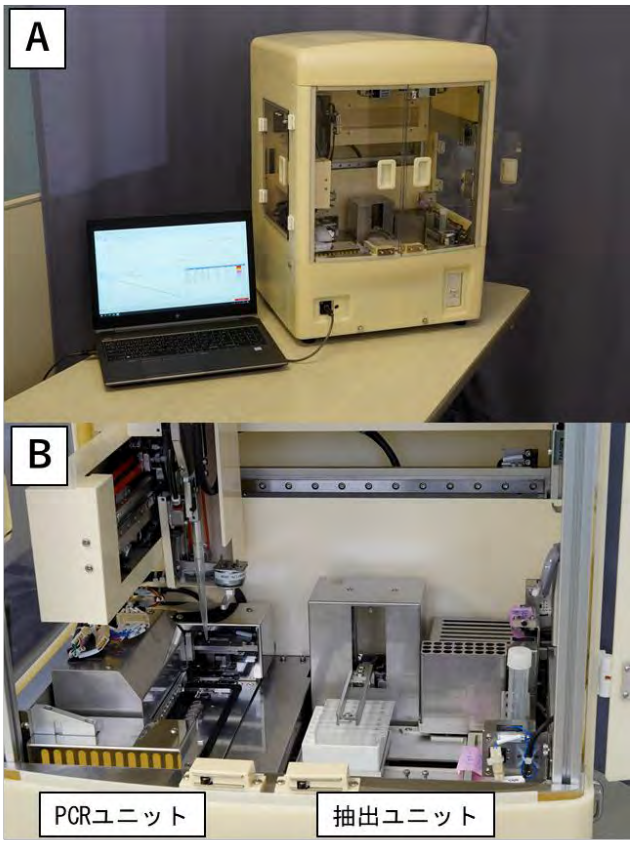


図1　磁気揺動核酸抽出ユニットとPCRユニットを含む一体型自動遺伝子検査装置
（野村メディカルデバイス株式会社との共同開発）A，装置外装；B，装置内部

本装置の抽出ユニットの構成を図２に示す。本装置では、磁気撹動をピペットチップ内で行うという仕様であるため、ピペットチップが装備されている。そして、電動ピペットで磁性ビーズを含む溶液を吸引後、撹動磁石アーム（磁石付きアーム）によりピペット内で撹動を行うことが可能となっている。

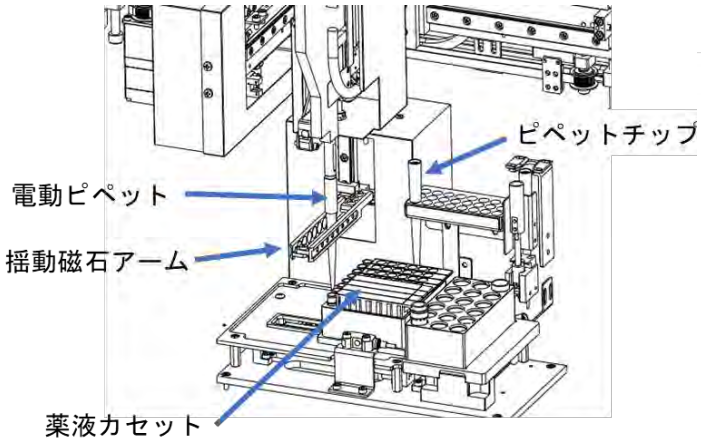


図２　磁気撹動核酸抽出ユニットの構成

薬液カセットは、通常の抽出試薬に用いられる溶解液、磁性ビーズ、洗浄液（2 種類）、抽出液を分注できるように６ウェルから構成されている（図 3）。本実験では、東洋紡株式会社の MagExtractor™ -Genome-の各試薬を用いて、各ウェルに分注して使用した。

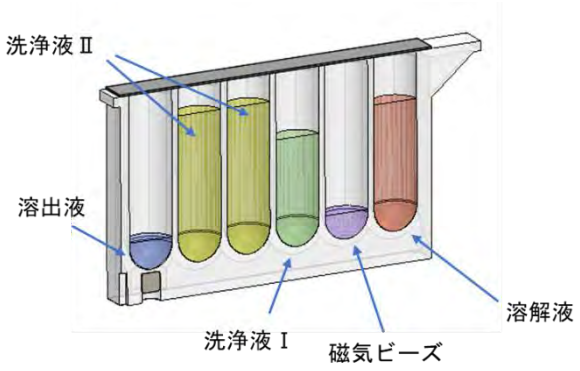


図３　薬液カセットの構成

抽出工程を図 4 に示す。ピペットチップ内で操作するシステムである。まず、磁気ビーズと溶解液を混合する。その後、検体を磁気ビーズと溶解液の混合液内に入れる。吸引・吐出後は、吸い上げた状態を維持する。上下左右に高速移動できる磁石付きアームにより、ピペット内で磁性ビーズを撹動する。廃液を行う際には、磁性ビーズを一方の壁に補足する。洗浄液での処理も同様に行う。最終的に溶出液を吸引し、その中でも同様に磁性ビーズを撹動し、磁性ビーズを補足した後、核酸溶液をマイクロチューブ内に吐出する。

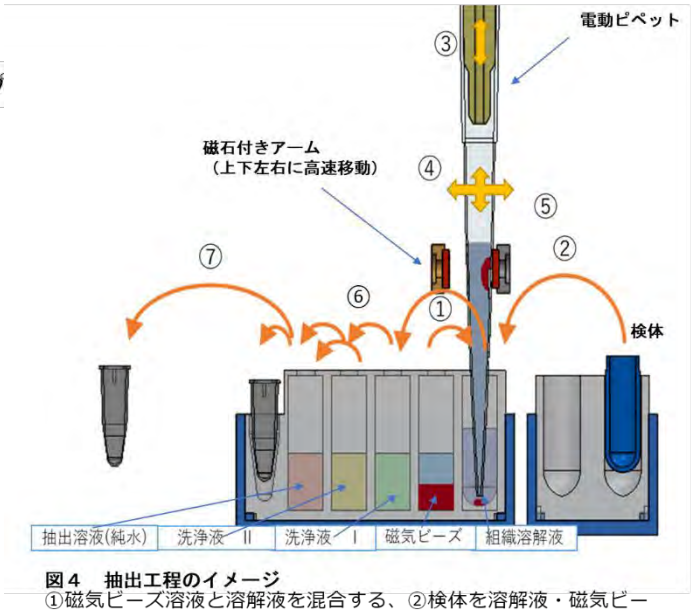


図４　抽出工程のイメージ
①磁気ビーズ溶液と溶解液を混合する、②検体を溶解液・磁気ビーズ混合液が入ったチューブへ移す、③吸引・吐出後、吸い上げた状態を保持する、④磁石付きアームを上下左右に高速移動、⑤磁気ビーズを捕捉してゆっくり排液、⑥洗浄液Ⅰ、Ⅱで磁気ビーズを洗浄する、⑦DNAを滅菌水に溶出する

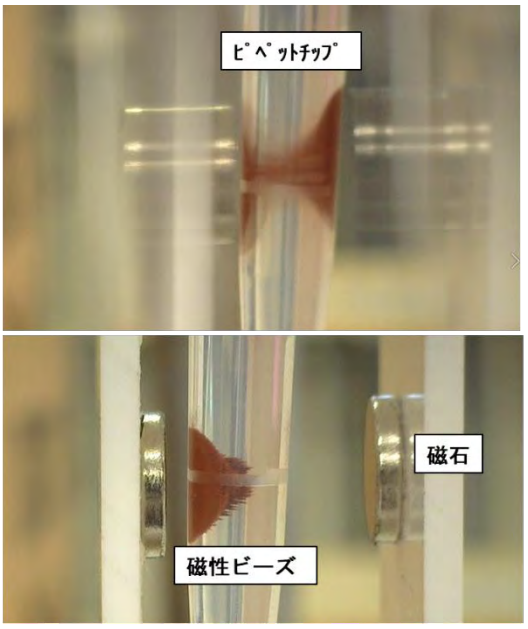


図５　磁石付アーム高速撹動時の磁性ビーズの動き

磁石付きアームを高速撹動させると、その動きに追従してピペットチップ内の磁性ビーズが動く（図5）。

②撹動機構によるゲノム DNA 抽出

今回、溶解や吸着の撹動ステップについて、磁石付きアームの動きを、四角状に低速で撹動する条件、一定位置で高速に撹動する条件、一定位置で低速に撹動する条件を設定して、ヒト由来培養細胞（肺上皮細胞株 A549 を使用）からゲノム DNA 抽出を行った(表 1)。コントロールとして、ホモジナイザーを用いて細胞破砕した後にマニュアル操作による抽出を行った。いずれの条件においてもゲノム DNA が抽出できた。抽出量については、有意差はなかったが、四角状に低速で撹動した場合に、高濃度で抽出できる傾向があった。一方､ゲノム DNA の純度の指標とした 260nm 吸光度と 280nm 吸光度の比は、いずれの条件でも 2.0 前後であり、精製度の高いゲノム DNA が回収できた。また、抽出溶液中のタンパク濃度は測定下限、感度以下などであった。

一方、収量は、マニュアル操作による抽出濃度に比較して 50%～80%程度であり、最適条件の検討は今後も必要となる。

表１　撹動条件とゲノムDNA抽出濃度・精製度

	溶解+吸着	抽出量 (ng/μl)	A260/A280
実験1	四角　　低速	42.5	2.05
実験2	一定位置　高速	33.7	1.92
実験3	一定位置　低速	27.4	2.11

③撹動システムにより抽出したゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR

各条件の撹動により得られたゲノム DNA を用いて、リアルタイム PCR を行った。反応試薬は、THUNDERBIRD®Probe qPCR Mix （東洋紡株式会社）を用い、ヒトアルブミン遺伝子を標的遺伝子として表 2 のプライマー、プローブを用いて行った。いずれの撹動条件から得られたゲノム DNA を使用してもリアルタイム PCR によって増幅が確認された（図 6)。

また、既成の TaqMan gene expression assay 試薬を用いたリアルタイム PCR も行ったが、こちらもいずれの条件でも増幅が確認された。

表２　リアルタイムPCRに用いたヒトアルブミン遺伝子に対するプライマー及びプローブ配列

プライマー配列
F:TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
R:CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
プローブ配列
FAM-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-BHQ1

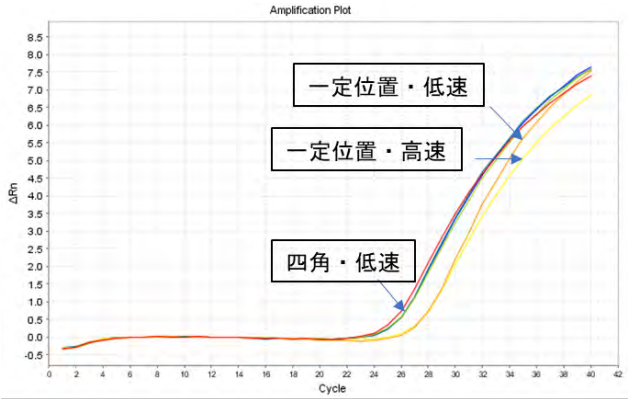


図６　リアルタイムPCR増幅曲線

４．まとめ

磁気撹動核酸抽出ユニットと PCR ユニットを含む自動装置を開発し、磁気撹動核酸抽出機構が十分有用であるという結果が得られた。本成果をもとに、さらに小型かつ簡便な磁気撹動核酸抽出装置や試薬キット化の開発を目指したい。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、研究助成のご支援を賜りました公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Yamaguchi A, Matsuda K, Uehara M, Honda T, Saito Y. A novel automated device for rapid nucleic acid extraction

utilizing a zigzag motion of magnetic silica beads.
Anal Chim Acta. 2016;906:1-6.

蛍光ペプチドを用いた新型コロナウイルスの迅速検出法の確立

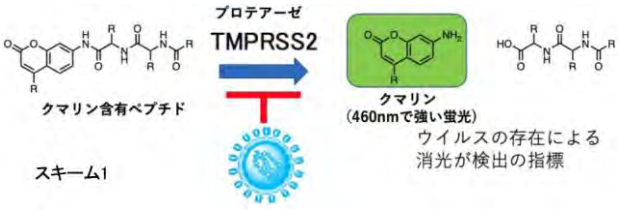
研究責任者　大村智記念研究所
微生物応用化学研究室
助教授　　君嶋　葵

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症 COVID-19 は、パンデミックを引き起こし、全世界感染者数 1.93 億人、死亡者数 4414 万人に達する新興感染症であり（2021 年 7 月 24 日現在）[1]、世界的に迅速かつ有効な対策が求められている。世界中への蔓延の問題から、COVID-19 の実態を把握し適切な医療を提供するためにも、診断法開発は緊急に進める必要がある。しかしながら、医療現場で使用可能な迅速診断系や血清抗体診断法は未だに確立されておらず、新型コロナウイルス感染疑いのある者の病原体検査は極めて困難な状況である。現状では、新型コロナウイルス検査は、精度や効率性を考慮して real time-PCR 法が採用されているが、検査に数時間から一日を要し、保健所や限られた病院でのみで実施されているため、多くの検体を一度に処理できない問題がある。さらに、検体採取や検体保存の条件などで偽陽性、偽陰性の課題もある。COVID-19 感染者の PCR 検査が陽性となる割合は高くても 70%程度と考えられており [2]、検査結果の判断は慎重に行う必要がある。加えて、検査には、患者の鼻咽喉のぬぐい液を用いる必要があり、検査者にも感染のリスクが高くなる現状がある。

２．内容

本研究では、COVID-19 の迅速かつ正確な診断キット開発を目的に、従来の PCR 法に代わる新型コロナウイルス検出法の確立を行う。これまでに、新型コロナウイルスが人体に感染する際には、細胞の表面に存在する ACE2 にウイルスの spike タンパク質（S タンパク）が特異的に結合したのち、宿主の TMPRSS2(Transmembrane protease, serine 2)に分解されることで、ウイルス外膜と細胞膜の融合が起きるが報告されている [3]。TMPRSS22 は標的のタンパク質の数アミノ酸残基を認識し、加水分解を触媒するプロテアーゼとして知られている。そこで、申請者は TMPRSS2 の S タンパク認識部位を模倣したクマリン含有ペプチドを合成し、TMPRSS2 によって認識後に、加水分解された際に遊離するクマリンの蛍光の有無をウイルス検出法として利用できるのではないかと着想した。すなわち、クマリン含有ペプチドは TMPRSS2 に加水分解を受けることで蛍光が生じるが、より親和性の高い新型コロナウイルス存在下では合成ペプチドは加水分解を受けないために、蛍光が消光する。本系を利用すれば新規ウイルス検出法として利用できると考えた（スキーム 1）。本手法はクマリン蛍光の消失を指標にウイルスの検出を行うため、従来法の課題であった検査時間の大幅な短縮が可能となることに加え、

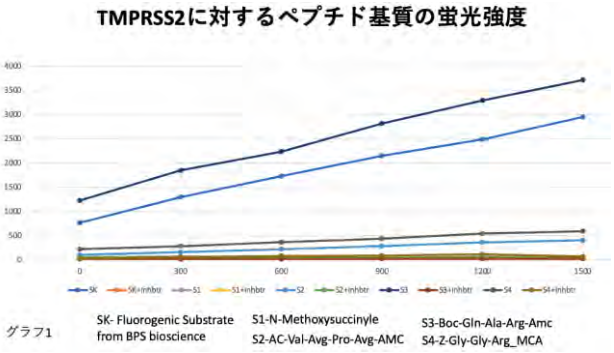


蛍光プレートリーダーを用いることで一度に多くの検体を簡便かつ迅速に検査できることが大きなメリットと考える。さらに、本検出法は唾液

を検体として用いることができるため、検査者の感染リスクを下げることができる。

３．成果

ウイルス検出に先立ち、まず、TMPRSS2 によって分解される基質の選定を行った。Hall らの報告[4]を参考に、４つの蛍光物質を含有した基質 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe4-methoxy-2-naphthylamide,AC-Val-Avg-Pro-Avg-AMC,Boc-Gln-Ala-Arg-Amc,Z-Gly-Gly-Arg_MCA を調製した。そして、TMPRSS2 との反応性違いを比較することにした。種々条件検討の結果、良好な感度で蛍光を検出することのできる条件を見出した。



グラフ1

結果として、市販の蛍光基質を上回る Boc-Gln-Ala-Arg-Amc を見出すことができた(グラフ１)。以上の結果をもとに、連携研究者らと生のウイルスを用いて検討を行っている。

４．まとめ

蛍光ペプチドを用いた新型コロナウイルスの迅速検出法の確立に向けて、ペプチド基質を調製し、蛍光強度をそれぞれ検証した。検討の結果、Boc-Gln-Ala-Arg-Amc が TMPRSS2 に分解されて良好な蛍光性を示すことを明らかにした。

謝辞

緊急支援新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム採択いただきましたことに深く感謝申し上げます。本助成により研究が進展し本成果を見出すことができました。さらに、この研究を発展できるよう精進したいと存じます。この場をかりて御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1) https://vdata.nikkei.com/newsgraphics/coronavirus-world-map/

2) https://www.hc.u-tokyo.ac.jp/covid-19/tests/

3) *Cell* 2020, *181*, 1

4) *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2020, *3*, 5

接触ネットワークを用いた効率的な外出規制スケジュールの検討

研究責任者　ニューヨーク州立大学バッファロー校　数学科
准教授　　増田　直紀

１．はじめに

2020年4月14日に、ハーバード大学が、COVID-19を抑制するためのソーシャル・ディスタンシング（SD）は2022年まで必要になりうる、という研究成果を発表した。今後、ロックダウンを含む厳しい SD が再度必要になる可能性は低くなく、したがって、COVID-19の爆発的な流行は抑えると同時に、経済活動や生活の質を最低限よりもかなり高く保つ方策が渇望されている。

興味深いことに、パナマは、女性が火・木・土曜日、男性が月・水・金曜日に買い物に行って良いという規則をいち早く導入した。しかし、今のところ、このように人と人のパターンを「工学」すること、つまり、どのような外出制限が効率的か、効率的な外出制限をどうデザインできるか、についてはおしなべて未知である。本研究の目的は、効率的な外出制限のデザインである。外出をとにかく厳しく制限すれば、COVID-19は十分に抑圧される。本研究では、そうではなく、COVID-19を完全ではないが何とか抑圧し続けつつ、経済・社会活動をなるべく拡大する方法を、データと数理、とくに時間変化するネットワークの解析手法に基づく方法を用いて見出すことを目指す。

２．内容・成果

本研究期間の中で、主に、外出制限を「工学」するために必要となる数理理論を構築した。具体的には、ネットワークが周期的に切り替わること（例えば週周期での変化）を仮定し、標準的な感染症動態を表す数理モデルの 1 つである SIS モデルのネットワーク版の動態（微分方程式で表される）を、フロケ（Floquet）の理論を用いて解析した。フロケの理論は、時間について周期的な微分方程式を、(A) 純粋に周期的なダイナミクスの部分と、(B) 変数値が時間に対して指数的に変化していく部分との積に分解する方法である。変数値は、各人口クラスにおける感染者の割合を表す。したがって、(B) の部分がもし指数的増幅を示すならば、感染者が（感染率パラメータが感染しきい値の付近である場合に）増えて行く、したがって感染が抑えられていない状況を示す。(B) の部分がもし指数的減少を示すならば、感染者が減ることを表す。このように分解することによって、ネットワークのどの部分にどの時刻に働きかけるような外出制限をデザインするのが効果的であるか、について指針が得られることが期待されるのである。

現状では、そのような分解、感染しきい値を、与えられた周期的なネットワークの関数として表すための表式、その離散時間版、パロンドのパラドックス、共振現象などについて、いくつかの数学的な結果。定性的理解、基礎的な数値計算結果が得られた段階である（図1）。

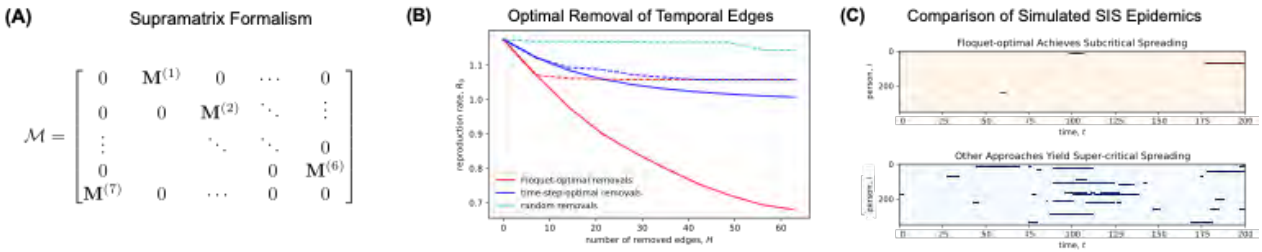


図 1：フロケ理論に基づいた感染抑制の最適化。(A) 感染動態をコードする 7 x 7 ブロックからなる行列。(i, j) ブロックは、i 日目（1 週間の中で）のネットワークが j 日目のネットワークに与える影響を表す。実際には、i 日目の感染動態の結果が i + 1 日目にその初期状態として伝達されることのみを仮定すればよいので、(i, i + 1) ブロックのみに接触ネットワークを表す行列が入り、その他のブロックはゼロ行列となる。(B) ネットワークの枝を除去していくと、縦軸で表される感染の程度の指標が小さくなる。ただし、その度合は、本提案手法にしたがって除去する枝を順番に選択していく場合（赤の実線）の方が、他の方法を用いて枝を除去していく場合（他の線）よりも大きい。(C) 枝の除去を行ったネットワークにおける感染シミュレーション。本提案手法によって枝を除去する場合（上のパネル）の方が、他の方法で枝を除去する場合（下のパネル）に比べて、感染を抑えることができている（濃い横線が感染状態を表す）。

3．まとめ

本研究では、ネットワークに週の周期を持つリズムを仮定して、戦略的に外出規制を行うための数理手法を確立し応用する、という目標に向けて、1 年間でなされるべき研究の質量が達成されたと考える。本研究が公式には終了する 2021 年 7, 8 月には、夏の間の研究を行う博士課程学生を本研究に割り当てることができており、さらなる研究の発展が見込まれる。また、テストデータを準備することは、データについての規制や前処理にかかるコストの観点から簡単ではないが、一定の進捗を見ている（前処理が行われている最中である）。本助成期間中には、アメリカの National Science Foundation （日本の科研費の研究費が大きい項目にだいたい対応する）に、本研究の後継と位置づけられる研究提案が採択され、開始しつつある。そこでは、本研究成果を受けて、さらなる理論開発やデータによる実装等を行う計画である。

謝辞

本研究助成に対して、中谷財団に感謝申し上げる。

発表論文

1) Naoki Masuda, Joel C. Miller, Petter Holme. Concurrency measures in the era of temporal network epidemiology: A review.
Journal of the Royal Society Interface, 18, 20210019 (2021).

SARS-CoV-2 のパラレル 4 本鎖 RNA をターゲットとした新型コロナウイルス検査法の開発

研究責任者　九州工業大学　工学研究院
物質工学研究系
教　授　　竹中　繁織

1．はじめに

新型コロナウイルス（2019-nCoV/SARS-CoV-2）の感染症 (COVID-19)が世界的に広まっている。世界保健機構(WHO)がパンデミック（世界的大流行）だと公式に宣言した。コロナウイルスは RNA ウイルスである。RNA ウイルスは変異し易く、これによってウイルスの表面構造が刻々と変化する。従ってヒトの免疫系を掻い潜り重篤化するし、何度も感染する可能性がある。このような RNA ウイルスの診断のためには、RNA ウイルスの変わりえない構造をターゲットにする必要がある。迅速診断を考えると RNA ウイルス特有のタンパク質

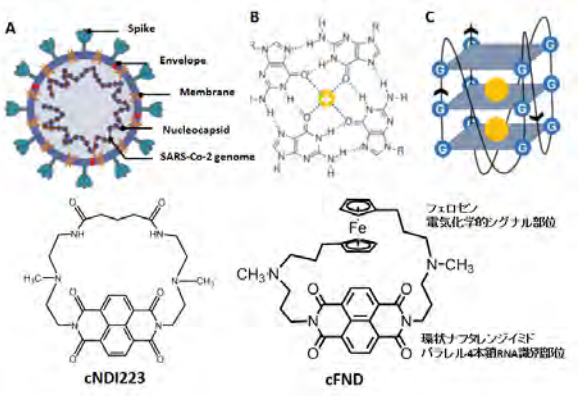


図１．SARS-CoV-2 の構造．B：G-カルテット，C：パラレル型 4 本鎖 RNA 構造．申請者が設計合成した**NDI223**.4本鎖核酸のうちパラレル型のみに強く結合．本研究で設計する分子 **cFND**．パラレル 4 本鎖 RNA に結合して電位は変化して SARS-CoV-2 のパラレル 4 本鎖 RNA 量に従って電流値が増加すること期待している.

(図 A に示した Spike タンパク質が利用されている)に対する抗体によるイムノクロマトによる迅速診断が期待されるが、RNA 変異により RNA ウイルスの表面抗原が変化するために難しい（新型コロナウイルス に感染していたかどうかを調べる IgG/IgM 抗体の検査法は実現されている)。最近、比較的変異の少ないヌクレオカプシド・タンパク質抗原をターゲットとしたイムノクロマト診断が開発されてきているが、精度が低いため確定診断のためにはリアルタイム PCR(RT-qPCR)による RNA ウイルスに特徴的な RNA 遺伝子量によって診断が行われているのが周知の事実である。

一方、RNA ウイルスの RNA には、RNA が変異しても遺伝子制御が正確に行われる機構が存在している。この一つが 4 本鎖 RNA 構造である。この 4 本鎖 RNA はパラレル型と呼ばれる特徴的な構造である。新型コロナウイルスに対しても特徴的なパラレル 4 本鎖 RNA が存在することが明らかになってきている [1)]。この特徴的な構造を高感度で検出できれば、リアルタイム PCR より迅速でイムノクロマトより精度の良い手法を実現できると期待される。

本研究では、申請者がこれまで提案してきた電気化学的遺伝子検出手法とパラレル型 4 本鎖 RNA 検出プローブを組み合わせた新型コロナウイルスの電気化学的検査法を実現することを目的とする。図に設計分子 cFND の例を示した。

２．内容

申請者は、4 本鎖核酸に特異的に結合できる環状ナフタレンジイミドの開発を行ってきた[2]。特に図 1 に示した cNDI223 は通常の 4 本鎖構造として知られているハイブリッド型に比べパラレル型に強く結合することが明らかとなった。また、申請者は、フェロセンを導入したナフタレンジイミド誘導体を用いた目的遺伝子の電気化学的検出法を行ってきた[3]。最近ではヒトの染色末端にあるテロメア DNA の伸長活性を示すテロメラーゼ（癌のマーカーとして知られる）活性を間接的に検出できるシステムを開発して電気化学的癌診断法を開発してきた[4]。また。ごく最近環状フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体を合成して 4 本鎖核酸の電気化学的検出に成功した[5]。申請者が行ってきたこの二つの研究を組み合わせることによって新型コロナウイルスの 4 本鎖 RNA を指標とした電気化学的検査法の確立を目指す。このためにはパラレル 4 本鎖 RNA 構造を識別できる環状ナフタレンジイミドと電気化学的活性部位の修飾を実現する必要がある。この機能を同時に実現できることによって本研究目的を実現できる。図 1 に設計分子 cFND を示したが、合成経路の検討によって関連した誘導体 cFND1, 2 の合成を行った。このような誘導体のフェロセンの酸化還元電位は 0.2-0.3V 付近で変化し、また、4 本鎖核酸への結合によっても電位が変化すと期待される。これはフェロセンの置かれたミクロ環境下に依存することが明らかになっている。フェロセンに化学的に連結する際の官能基によっても電位をある程度期待どおりに変化できる。このような cFND の特性を活かして最適プローブの設計・合成を行い、基本的な電気化学的挙動に関して検討した。

３．成果

すでに環状ナフタレンジイミドのリンカー長を短くすることによってパラレル RNA への結合能が増大し、他の構造のハイブリッド型 4 本鎖には結合しないことを明らかにした。この選択性はリンカー長が短いことに起因している。この長さを保ったまま電気化学活性基であるフェロセンを導入する。この考えに従って設計した分子を図に示した。合成 cFND 誘導体の最適化と性能評価により目的とする検出系を実現できると考えている。特に設計分子はパラレル 4 本鎖 RNA に結合することによって電位が変化すると期待される。本研究では、図２に示した cFND1,2 を設計合成した。cFND1,2 は環状リンカー側鎖内に導入したもので cFND2 は cFND1 に比べ炭素数を 4 個短くしたものである。

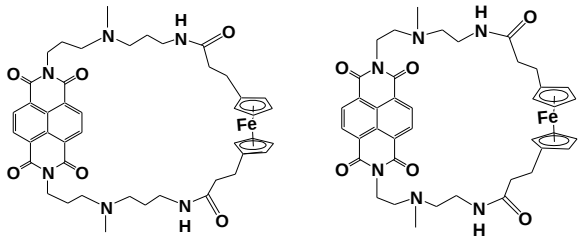
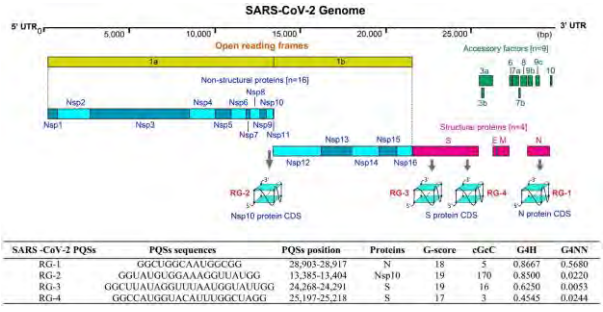


図２．本研究で設計合成した cFND 誘導体，cFND1,2 の化学構造.

ごく最近、SARS-CovV-2 ゲノム上の G4 RNA に関して詳細研究された論文[6]は報告された。図３に示したように SARS-CoV-2 のゲノム上に G4 形成可能配列がゲノム解析より見出されており、特に RG-1、RG-2、RG-3、RG-4 はそれぞれヌクレオカプシド タンパク質（N）、非構造タンパク質 10（Nsp10）、スパイク糖タンパク質（S）のコード配列（CDS）領域に位置し、これらの RNAG4 形成は、SARS-CoV-2 のこれらのタンパク質の機能を調節



SARS -CoV-2 PQSs	PQSs sequences	PQSs position	Proteins	G-score	cGcC	G4H	G4NN
RG-1	GGCUGGCAAUGGCGG	28,903-28,917	N	18	5	0.8667	0.5680
RG-2	GGUAUGUGGAAAGGUUAUGG	13,385-13,404	Nsp10	19	170	0.8500	0.0220
RG-3	GGCUUAUAGGUUUAAUGGUAUUGG	24,268-24,291	S	19	16	0.6250	0.0053
RG-4	GGCCAUGGUACAUUUGGCUAGG	25,197-25,218	S	17	3	0.4545	0.0244

図３．SARS-CoV-2 のゲノムとターゲットとして期待される G4 配列．RG-1 と RG-2 が候補として期待される[6].

している。従って、これらの部位は SARS-CoV-2 の生存に重要な部位であるため変異は起こりえない。本論文では、RG-1 と RG-2 の G4 RNA 構造をターゲットとした薬剤の開発を目的としている。本研究では、これらの部位の検出を目的として、cFND1,2 と RG-1 と RG-2 との相互作用を検討した。cFND1,2 は、ナフタレンジイミド部位を有するので 382 nm 付近に吸収極大を有する。この部位が G4 RNA の G-カルテットとスタッキング相互作用によって結合すると期待される。これによってナフタレンジイミド部位の吸収極大が大きく減少する（淡色効果）[7]。従って、cFND1, 2 の水溶液への RNA 添加による吸収極大の変化をモニタリングすることにより結合挙動を解析することができる。

図４に cFND2 への RG-1 または RG-2 添加に伴う吸収スペクトル変化を示した。cFND2 は、RG-1 または RG-2 添加によって 70%と大きな淡色効果を示した。スペクトル変化を用いた Scatchard 解析によっていずれも 10^6 M^{-1} 以上の結合定数とこれら G4 RNA に強く結合することが明らかとなった。cFND1 に関しても同様であったが、パラレル型 G4 構造選択性が高い cFND2 に関して更に検討を行った。

このように期待したように cFND2 は SARS-CoV-2 の RG-1 と RG-2 に強く結合することが明らかとなったので cFND2 の電気化学的挙動を検討した。RG-1,2 に共通するパラレル G4 構造を有する c-myc 修飾電極での電気化学挙動を調べた。図５に cFND1,2 のサイクリックボルタモグラムを示した。電位をプラス側とマイナス側に掃引したときにフェロセンの酸化還元反応に伴う電流値が得られた。cFND1,2 の $E_{1/2}$ はそれぞれ 0.28 V、0.26 V であった。このことは、cFND1,2 が G4 パラレル構造に結合して電気化学的応答を示すことを示している。cFND1,2 は、G4 パラレル構造は無い場合よりも若干電位がプラス側にシフトすることが示された。これは G4 結合を電位シフトによって識別できる可能性を示している。また、cFND1,2 のフェロセン部位付近の化学構造は変化していないのに cFND1 よりも cFND2 の方がより正側にシフトしていた。これは、環状リンカー長の短くなった cFND2 の方がフェロセン部位とナフタレンジイミドとが近接していることを示唆しており、より酸化還元反応が起こりやすくなっていることを示唆している。

電極上の G4 量は、サブピコモルであると考えられるので本結果から最低でのサブピコモルの検出が可能であると期待される。

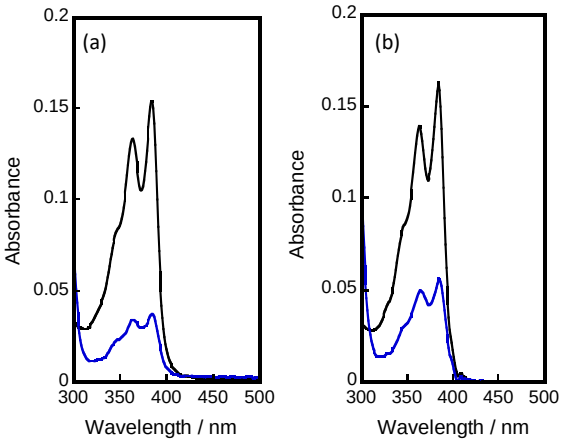


図４. SARS-CoV-2 に特徴的なパラレル G4 構造を有する RG-1(a)または RG-2 (b) (8 μM)の非存在下、存在下での 5.6 μM cFND2 の吸収スペクトル. 条件：10 mM Tris-HCl (pH7.2)、100 mM KCl.

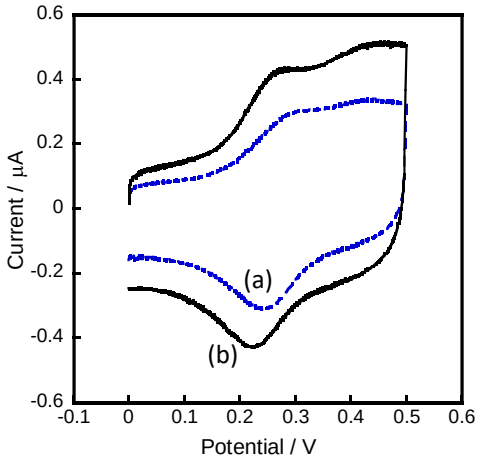


図５. パラレル G4(c-myc)電極を用いた cFND1 (a)および cFND2 (b)のサイクリックブルタモグラム：条件： 40μM cFND1,2, 100 mM AcOH-AcOK with 100mM KCl

４．まとめ

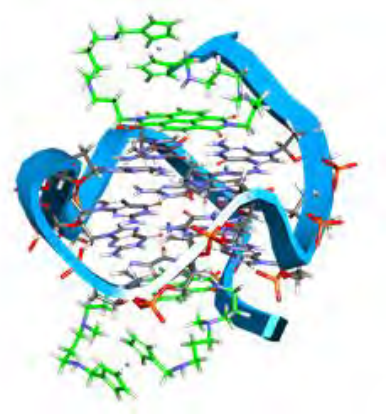


図６．cFND2 と G4 パラレル構造との複合体のコンピューターモデリング.

図６に今回設計合成した cFND2 とパラレル G4 構造との複合体のコンピューターモデル図を示した。期待したようにＧカルテット平面とナフタレンジイミド環とが効果的にスタッキング相互作用されている。また、フェロセン部位も G4 スペーサーに対して立体障害もなく結合すると期待される。本研究では、SARS-CoV-2 の RG-1 と RG-2 に cFND2 が強く結合することができて電気化学的応用を示すことを明らかにした[8]。また、サブピコモル以下の検出感度を持つ可能性を示すことができた。さらなる検討によって以下の手順による最終的な検査システムを確立できると考えている。

１）検体（鼻咽頭ぬぐい液・唾液など）から RNA 成分を抽出する（すでに RT-qPCR 用に精製キットが市販されている）

２）検出試薬を加えて溶液に電極を入れて電位をかけて流れる電流を検知する。

３）電位によって特異性、電流によって量を定量化する。

謝辞

共同研究者の佐藤しのぶ准教授、金好秀馬君に感謝する。本研究は、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団の技術開発研究助成により遂行されました。

参考文献および発表論文

1) R. Zhang, X. Ke, Y. Gu, H. Lin, X. Sun, *bioRxiv*, 05 Jun 2020. DOI: 10.1101/2020.06.05.135749　新型コロナウイルスのゲノム RNA 上のどのようにパラレル４本鎖構造が存在するかについて調べられた論文。これ以外のも最近になって数多く報告されている。その中心は４本鎖 RNA をターゲットとした薬の開発に注がれている。

2) Y. Esaki, Md. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *Chem Commun.*, **50**, 5967 (2014).

3) K. Haraguchi, S. Sato, M. Habu, N. Yada, M. Hayakawa, O. Takahashi, I. Yoshioka, K. Matsuo, K. Tominaga, S. Takenaka,, *Electroanalysis*, **29**, 1596 (2017).

4) K. Mori, S. Sato M. Kodama, M. Habu, O. Takahashi, T. Nishihara, K. Tominaga, S. Takenaka, *Clin. Chem.*, **59**, 289 (2013).

5) S. Kaneyoshi, T. Zou, S. Ozaki, R. Takeuchi, A. Udo, T. Nakahara, K. Fujimoto, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *Chem. Eur. J.*, **26**, 139 (2020).

6) C. Zhao, G. Qin, J. Niu, Z. Wang, C. Wang, J. Ren, X. Qu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 2-9 (2020).創薬を目指した新型コロナウイルスのゲノム RNA のパラレル４本鎖構造と G4 結合分子との相互作用解析。

7) S. Takenaka, *Polymer J.*, 53, 415 (2021).

8) S. Kaneyoshi, S. Sato, S. Takenaka, unpublished data.

屋内空間エアロゾルに存在するウイルス粒子の高度検出機器システムの開発

研究責任者　高知大学　医学部　環境医学
特任教授　　荻野　景規

１．はじめに

新型コロナウイルスは、同一空間内での感染リスクが非常に高いことから、エアロゾルを介した感染経路が想定される。病院や高齢者施設等での集団感染を抑制するためには、空間のエアロゾルに存在するウイルス粒子を継続的にモニタリングする必要があるが、その手法は確立されていない。

２．内容

長崎大学呼吸器内科、金沢大学ウイルス感染症制御学との共同研究を開始し、長崎大学病院に入院した患者室に設置されたナノサンプラーII の各径で採集されたエアロゾルに対して新型コロナウイルス PCR キットによる検出試験を開始した。また金沢大学より譲渡されたインフルエンザウイルスを用いて、フィルターに噴射し乾燥した後に、再度フィルターからのウイルスを検出する場合の最適な方法を模索した。さらに新型コロナウイルスの外殻タンパク質である S１蛋白とエアロゾルが特異的に結合吸着されることが、コロナウイルスの肺胞からの侵入を容易にしているとの仮説をたて、エアロゾルに結合するタンパク質の再解析を行なった。

３．成果

2020 年度の新型コロナウイルス感染症患者５名を解析した。PCR の CT 値からエアロゾルに新型コロナウイルスに含有されている可能性が示唆された。粒径等の特徴を見出すには、今後の症例の蓄積が必要である。インフルエンザウイルスの実験では、検体運搬用の不活化液が、RT-qPCR の検出力を低下させる可能性が判明した。乾燥時間等、他要素の影響についても今後検討し、フィルター内のウイルス量を正確に把握する手法をさらに追求していく必要がある。最後に、エアロゾルに結合するタンパク質の再解析では、一部がニトロ化されたヒトアルブミンが検出された。我々はエアロゾルとアルブミンとの結合が肺胞から体内への侵入を促進する知見も得ていることから、新型コロナウイルスのエアロゾル感染の分子機序とも関連している可能性があると考えられた。この知見は国際誌 Atmospheric Pollution Research（IF: 3.527 ）に掲載された[1)]。

４．まとめ

新型コロナウイルス感染症では、感染経路が不明なケースが多い。その原因として、多くのウイルスを排出する無症候性感染者の存在が問題となっている。無症候性感染者を見つけるために、エアロゾル中の粒子とウイルスの結合を利用したウイルスの検出法の開発が急がれる。

謝辞

この研究に協力いただいた、長崎大学呼吸器内科尾長谷靖准教授、金沢大学ウイルス感染症制御学市村宏教授、産業医科大学第 3 内科荻野学芳助教には､感謝申し上げる次第である。

発表論文

1) Ogino N et al., The identification of tyrosine-nitrated human serum albumin in airborne particulate matter from Japan. Atmospheric Pollution Research 2021 12(21)

Sタンパク質結合人工抗体を用いたコロナウィルス濃縮法および抗原検査法の開発

研究責任者　名古屋大学　大学院工学研究科
生命分子工学専攻
准教授　　林　剛介

１．はじめに

2021年現在、未だに世界中で新型コロナウイルスは猛威を奮っており、パンデミックは収まる気配がない。ワクチン接種により、一定の抑制効果は見られているものの、今後新たな変異株の出現によってワクチンの効果減衰が懸念されている。治療薬の開発は遅れており、またPCR検査や抗原検査の高感度化についても未だに発展途上の段階にある。

２．内容

本研究では、新型コロナウイルスの表面タンパク質であるSタンパク質に結合する人工抗体（IgG抗体よりも分子サイズが1/10程度と小さく、大腸菌発現による作製が可能で、標的タンパク質に結合することが可能なタンパク質）を開発することで、新型コロナウイルス感染症の治療薬および診断法の確立を目指した。これまでに20種類以上の人工抗体骨格が開発されているが、本研究ではヒトフィブロネクチン由来の「モノボディ」を用いることとした。Sタンパク質結合モノボディの取得には、当研究室で以前開発された試験管内分子選択法であるTRAPディスプレイ法を用いた。得られたモノボディに対して、in vitroでのアッセイに加えて最終的には患者由来の新型コロナウイルスを用いた試験まで行った。

３．成果

S1タンパク質に対してTRAPディスプレイ法を行うことで、わずか1週間のうちに5種類以上のS1結合モノボディの取得に成功した。各モノボディクローンを大腸発現にて作製し、親和性測定をおこなったところ、いずれもnM前後の値を示し、非常に高い親和性でS1タンパク質に結合することが明らかとなった。異なるエピトープに結合するクローンが存在したため、サンドイッチELISAによるSタンパク質の好感度検出にも成功した。また、ACE2とSタンパク質の相互作用を阻害するクローンも得られ、培養細胞へのウイルスの感染を阻害する中和活性も確認された。実際のウイルスに結合することが明らかとなったため、患者由来のウイルスをモノボディにより濃縮し、PCR検査の感度を上昇させることに成功した。

４．まとめ

本研究により、新型コロナウイルスを高い結合能で認識する人工抗体を迅速に取得可能であることが明らかとなった。複数のエピトープを認識するクローンの取得も達成できたため、今後これらのクローンを用いて高感度な抗原検査キットの作製が可能になると期待される。また現在は変異株に結合するクローンも得られてきており、新たなパンデミックに迅速に対応可能なプラットフォーム技術を確立できたと考えら

れる。これらの研究成果は、学会や論文[1),2)]によって国内外に発信している。

謝辞

本研究は、名古屋大学村上研究室と名古屋医療センター岩谷研究室の共同研究で行われた成果であり、研究を指揮した村上裕先生、実際に抗体取得実験を行った近藤大志博士、および関係者のスタッフ・学生の皆様にこの場を借りて感謝いたします。またウイルスを用いた研究を指揮した岩谷靖雅先生および実験を行ったスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献および発表論文

1) Kondo, T.; Iwatani, Y.; Matsuoka, K.; Fujino, T.; Umemoto, S.; Yokomaku, Y.; Ishizaki, K.; Kito, S.; Sezaki, T.; Hayashi, G.; Murakami, H. Sci. Adv. 2020 6, eabd3916.

2) Kondo, T.; Eguchi, M.; Tsuzuki, N.; Murata, N.; Fujino, T.; Hayashi, G.; Murakami, H. bio-protocols 2021 in press

皮膚と接触する部分で使用可能なウイルス吸着，不活化材料の開発

研究責任者　東京農工大学
グローバルイノベーション研究院
教　授　　村岡　貴博

１．はじめに

簡便かつ安全にウイルスを吸着、不活化する材料は、感染症の拡散防止に有効である。一方、可逆的に不活化、活性化することのできる動的な吸着材料は、ウイルスの活性状態での捕獲、保存を可能にし、その取り扱い方法を拡大するとともに、新たなアッセイ方法の開発につながる基盤となりうる。数多くのウイルス吸着材料が開発されている中で、可逆的に不活化、活性化することを可能にする材料、技術はいまだ限定的である。

本研究では、細胞膜を構成するリン脂質を基盤とする細胞サイズベシクルを用いて、その内部への包摂によるウイルスの不活化と、再放出による活性化を可能にする新材料の開発に取り組んだ。ウイルスが細胞内部へ侵入するメカニズムを模倣し、ウイルスと接着する部位と、可視光に応答して膜を変形する機械的運動部位を有する人工トランスポーター脂質をデザインした。開発した人工脂質は、静電相互作用によりウイルスを吸着するとともに、光に応答して大きな膜変形を誘導し、細胞サイズベシクル内部へのウイルスの封入を実現した。本材料は、従来技術では困難な、ウイルスを活性を保持したまま、感染性を抑えつつ取り扱うことを簡便かつ安全な操作で可能とするものであり、ウイルスの新たな取り扱い技術を提供する。

２．内容

アニオン性表面を持つウイルスを吸着するために、カチオン性の親水部を持つ人工トランスポーター脂質をデザインした。ウイルスの細胞サイズベシクル内への封入を実現するために、ウイルスの細胞内侵入経路のひとつであるエンドサイトーシスに注目した[1-3]。細胞膜表面へのウイルスの吸着を起点とし、膜のベシクル内部への陥入型変形を伴うプロセスである。細胞膜をはじめとする脂質二分子膜の変形は、直接的に膜曲率を変化させる機序[2]と、膜表面積を変化させる機序[3]が知られる。本研究では、後者のアプローチに着目した。このウイルス侵入経路から着想し、類似のプロセスによるウイルス取り込みを可能にする材料の開発を行った[4]。

３．実験方法

3.1. 人工トランスポーター脂質の合成

2-Nitrobenzaldehyde を原料とし、テトラヒドロフラン、水の混合溶媒中でトリブチルリンと反応させた。室温で１２時間反応させた後、水を加え、塩化メチレンで抽出した。抽出液を濃縮後、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、1,2-bis(2-nitrophenyl)ethane-1,2-diol を得た。

1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethane-1,2-diol　をエタノール、水の混合溶媒に溶解させた。反応溶液中に鉄、塩化アンモニウムを加え、２時間加熱

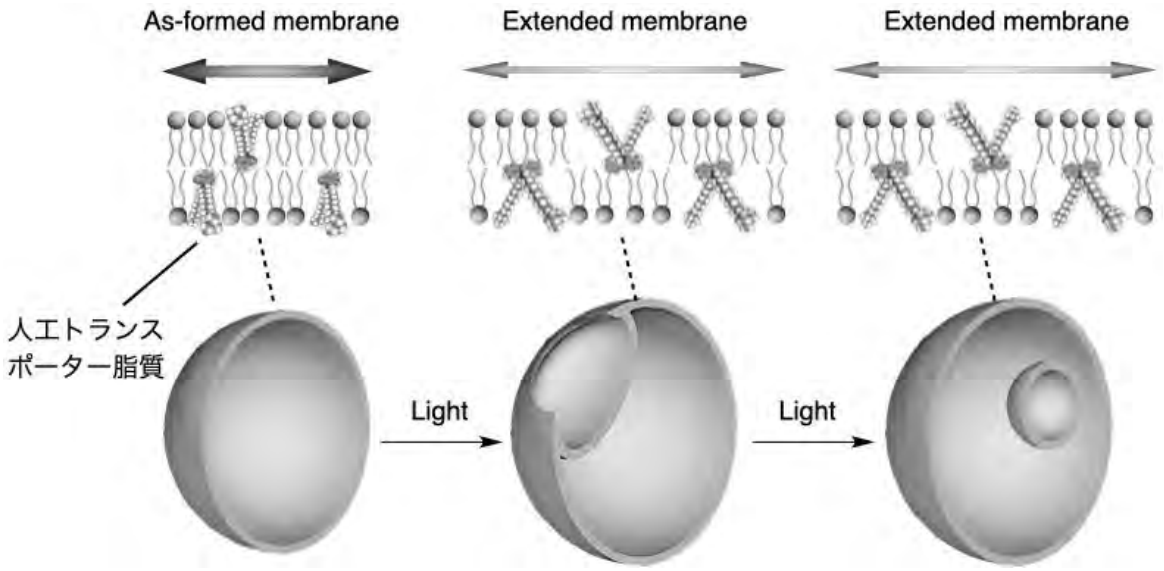


図１　人工トランスポーター脂質とリン脂質から構成される脂質二分子膜と、光照射による膜変形

した。冷却後、反応混合物に水を加え、塩化メチレンによって抽出した。抽出液を濃縮し、得られた混合物を再結晶し、1,2-bis(2-aminophenyl) ethane-1,2-diol を得た。

1,2-Bis(2-aminophenyl)ethane-1,2-diol をジメチルホルムアミドに溶解させ、低温で水素化ナトリウムと反応させた。室温に戻し、アジドブロモアルカンを加え、５時間反応させた。水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。抽出液を濃縮し、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、アジド化ジアニリン誘導体を得た。

アジド化ジアニリン誘導体を塩化メチレンに溶解させ、酸化剤と反応させた。５時間反応後、反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによってアジド化アゾベンゼン誘導体を得た。

アジド化アゾベンゼン誘導体をテトラヒドロフランに溶解させ、トリフェニルホスフィンを加えた。１５時間反応後、水を加え、さらに１０時間反応を行った。得られた混合物を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、アミノ化アゾベンゼン誘導体を得た。得られたアミノ化アゾベンゼン誘導体をヨードメタンによってメチル化することにより、カチオン性親水部を持つ人工トランスポーター脂質を合成した。

合成中間体ならびに人工トランスポーター脂質の分子構造は、精密質量分析、核磁気共鳴分光法によって確認し、決定した。

3.2. 細胞サイズベシクルの作成

細胞サイズベシクルは、静置水和法によって作成した。クロロホルムとメタノールの混合溶媒中に、リン脂質と人工トランスポーター脂質を溶解させた。窒素ガスの吹付けにより、混合脂質の薄膜を作製した。減圧乾燥の後、水を加え、水和することで、リン脂質と人工トランスポーター脂質から成る細胞サイズベシクルを得た。

3.3. 細胞サイズベシクルへのウイルス吸着と光照射による封入

リン脂質と人工トランスポーター脂質から成る細胞サイズベシクルに対し、トリスバッファー中に分散させたバクテリオファージウイルスを加えた。一時間静置後、青色光を照射し、遠心

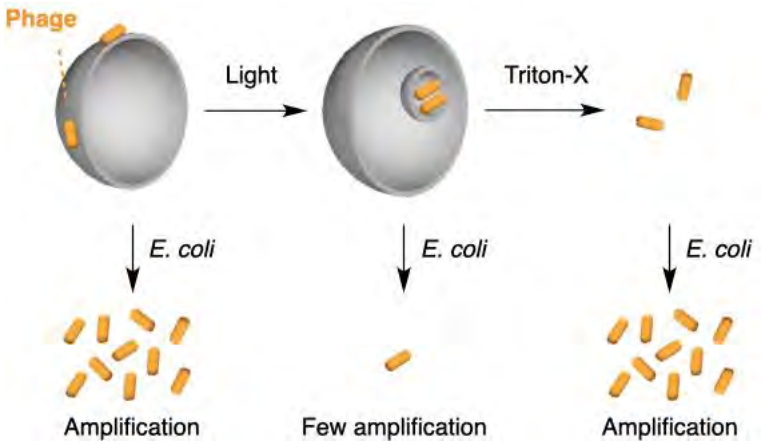


図２　エンドサイトーシス型ベシクル膜陥入によるファージウイルスの封入と膜崩壊による再放出

分離により非吸着ウイルスを分離した。

４．結果

4.1. 人工トランスポーター脂質の光応答性

人工トランスポーター脂質の中心骨格を形成するアゾベンゼン部分は、光に応答して異性化することが知られる。実際に、本研究で開発した人工トランスポーター脂質も、青色光と緑色光に可逆的に応答してシス体、トランス体間で異性化することが紫外可視吸収スペクトル測定から示された。

高速液体クロマトグラフィー解析から、青色光照射によって 66%が異性化することが示された。その後、緑色光を照射することで、99%以上が逆反応を示したことから、高い効率で可逆的に光異性化することが確認された。

4.2. 人工トランスポーター脂質とリン脂質の細胞サイズベシクル作成と光応答性

静置水和法による人工トランスポーター脂質とリン脂質の混合物から成る細胞サイズベシクルの形成を、位相差顕微鏡観察により確認した。紫外可視吸収スペクトル測定から、脂質二分子膜中の人工トランスポーター脂質も可視光に応答した異性化を示すことが確認された。高速液体クロマトグラフィー解析から、青色光照射によって 60%が異性化することが示された。

4.3. 細胞サイズベシクルの光膜変形

得られた人工トランスポーター脂質とリン脂質の混合物から成る細胞サイズベシクルは、可視光照射によって膜を大きく変形させ、陥入させることが位相差顕微鏡観察から示された。この現象は、ベシクルの内部体積と膜表面積の関係から近似的に理解することができる。膜陥入によって、ベシクルの内部体積は増加する。一方、ベシクル外膜を構成する分子数は減少する。この体積増加と分子数減少の両立には、一分子あたりの専有面積の増加が必要条件となる。人工トランスポーター脂質とリン脂質の混合物を用いて、ラングミュア膜を作成し、一分子あたりの分子専有面積を測定した。その結果、青色光照射により、分子専有面積が増加することが示された。人工トランスポーター脂質の、光に応答して膜表面積を拡張する機械的運動が、膜陥入を引き起こしたと考えられる。

4.4. 光照射によるウイルスの取り込みと再放出

人工トランスポーター脂質とリン脂質の混合物から成る細胞サイズベシクルに対し、バクテリオファージウイルスを加えたところ、膜表面へのウイルスの吸着が見られた。顕微鏡観察下で青色光を照射すると、膜変形が誘起され、膜陥入によるウイルスのベシクル内部への輸送が確認された。

ベシクル内部への封入による、ウイルスの感染性抑制効果を評価した。用いたファージウイルスは、大腸菌に対して感染する。感染性を定量評価した結果、光照射前に比べて、光照射後は感染性が約半減した。その後、トリトン X を用いてベシクル膜を破壊することで、封入したウイルスを再回収することができ、感染性も回復した。このことから、エンドサイトーシス型膜変形を利用したウイルスのベシクル封入と感染性抑制、さらに膜溶解による再回収と活性回復が確認された。

４．まとめ

本研究において、光照射によってウイルスの吸着、再放出を可能にするエンドサイトーシス型膜変形材料の開発に成功した。吸着、再放出によって、ウイルスの感染性抑制と、再発現を制御することが可能となる。温度変化などを必要としない本材料は、ウイルスを安全に取り扱う新たな手法を提供するものである。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団新型コロナウイルス感染症対策助成プログラムの支援で行われました。

参考文献および発表論文

1) Kolokoltsov, A. A., Deniger, D., Fleming, E. H., Roberts, N. J., Jr., Karpilow, J. M., Davey, R. A. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *J Virol.* 81:7786-7800, 2007.
2) Pauza, C. D., Price, T. M. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via recep- tor-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 107:959-968, 1988.
3) Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., Melikyan, G. B. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137: 433-444, 2009.
4) Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303: 495-499, 2004.
5) Yanagisawa, M., Imai, M., Taniguchi, T. Shape deformation of ternary vesicles coupled with phase separation. *Phys. Rev. Lett.* 100: 148102, 2008.
6) 内田紀之, 笠勇之介, 村岡貴博, 人工膜変形素子の開発:光応答性分子機械を用いたエンドサイトーシスのようなベシクル分裂, 第 70 回高分子学会年次大会, 3H08.

人工呼吸器の運用とそれに伴う様々な処置・ケアを包括的に扱える生体反応を呈示する看護シミュレータの開発

研究責任者　北海道大学大学院情報科学研究院
助教授　　小水内　俊介

1．はじめに

2020 年の前半, 新型コロナウイルス感染症の治療においては，緊急かつ大規模に人工呼吸器が必要とされた．本来，その操作には習熟を要する高度な機器だが，従来から必ずしも潤沢な訓練環境は整っていない．また，人工呼吸器を必要とする患者は併せて痰吸引などのケアも必要となり，ケア提供者の負担は大きい．それに加えて，いずれの処置も患者の咳を誘発するため, 患者-看護師間の飛沫感染防護のためにシールドボックス (図 1) やビニルカーテンなどが導入されつつあり，処置の難易度を高めている．症状が悪く活性が低い場合には，さらに気管切開，経管栄養，体位変換などの処置・ケアも必要となる．これらの処置・ケアはコロナ禍に限らず平時においても稀なことではなく，さらに在宅医療の浸透に伴い医療従事者でない家族もケアを担いうる．周期的な感染拡大の継続や別の感染症の流行に備え，人工呼吸器の運用に伴う様々なケアに対応できる人材の育成は，喫緊でもあり長期的にも有益である重要な課題である．

本研究では，我々がこれまで痰吸引手技にフォーカスして開発してきた「手技に対する生体反応を呈示する看護シミュレータ」[1]の技術を基盤として，人工呼吸，感染防護，痰吸引，経管栄養，体位変換の訓練機能を備えた看護シミュレータを開発する．

図 1　飛沫感染防護器具（コムネット）

2．内容

これまで我々が開発してきた看護シミュレータは，看護シナリオや痰吸引処置に応じてバイタルサイン（HR/Sp02），顔色・表情，咳嗽反射などの生体反応を呈示でき，仰臥位と側臥位の体位変換も可能である [1]．本研究では，人工呼吸，感染防護，経管栄養の機能をこの優先順で実装する．すなわち，これらの処置にも応じて患者模型の生体反応が変化するように連携させる．教育ツールとして，習熟度の評価や模範手技の予習などもできることが望ましいが，それらの機能は痰吸引に関して個別に開発中 [2), 3)] である．本研究では，ユーザが繰り返し使用して試行錯誤しながら技能習熟するためのツールの開発に課題を絞る．

人工呼吸器については，主流製品のうち一つをレンタルし，そのインタフェース（ボタンやモニタ，操作内容など）や酸素供給機能を調査のうえ，模擬装置を独自開発して再現する．インタフェー

スは実物の厳密な再現を旨とするが，酸素は実際に送るのではなくその流量制御情報を再現し，生体反応アルゴリズムと共有する．これにより，高価な人工呼吸器の実物が無くても同品質の体験・教育を提供しうることに本研究の価値がある（ただし社会実装の際は意匠権などを考慮する）．模擬装置のインタフェースは必ずしもすべて物理的な実装に限定せず，AR（Augmented Reality，拡張現実）映像の併用により将来的な製品変更への対応や情報連携を柔軟にする．AR 映像提示のためにはゴーグル型デバイスを必要とするが，今後定着するであろうフェイスシールドを想定すれば違和感はないと言える．

飛沫感染防護対策は，コロナ禍初期においては透明なビニールやアクリル板を用いたシールドボックスの自作が試みられていたが，周期的な感染拡大が一年以上続いた今日では話題に上らなくなり，陰圧室やガウン（個人防護具）が主流となった．もっとも，個室規模の設備の導入・運用や，ガウン脱衣時のウイルス飛散・付着などといった難点から，依然防護方法の充実が求められる．本研究では，基本的には処置の妨げとなるシールドボックスを設置する．この機能の導入により，防護器具存在下での処置の訓練だけでなく，より良い防護器具の開発・運用に資する．

経管栄養は，看護シナリオにおいて人工呼吸や痰吸引，体位変換などを踏まえた適切な順序やタイミングでの処置が重要である．しかし，通常は実施時間が長く訓練は容易でない．本研究では，生体反応がデジタルに制御できることを利用し，計測された滴下速度に応じて数十分後の生体反応を呈示する．明示的に時間を飛ばすことで，経管栄養の処置に対する反応をすぐに知ることができ，極めて高い訓練・教育効果が期待できる．

各機能の統合にあたり，ユーザテストはひとまず看護師経験のある共同研究者により実施する．コロナ禍以前には，我々は毎年，看護師・看護学生を募って開発機器の試用実験を行っており，将来的にはそのような機会にもユーザテストを実施する．

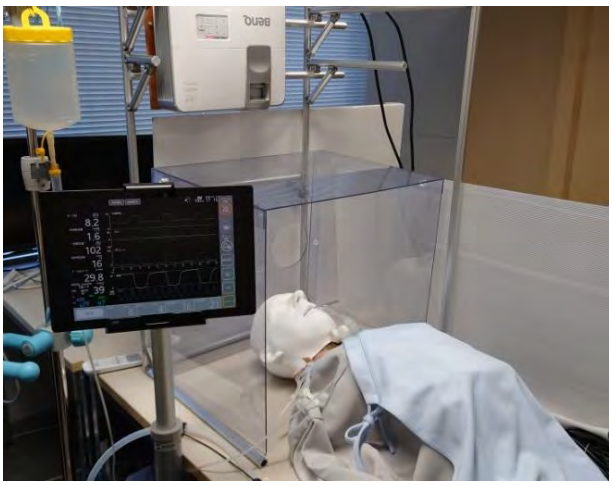


図 2　人工呼吸器の模擬装置の概観

図 3　人工呼吸器の 3DCG モデル

３．成果

3.1. 人工呼吸器の模擬装置の開発

人工呼吸器の模擬装置は，主流製品のうち比較的新しいモデルである NKV-330 を対象とした．模擬装置では，スタンドに取り付けられたタブレット端末(図 2)に GUI(Graphical User Interface，ボタンやモニタ，操作内容など）を表示するとともに，タッチ操作を読み取ることで，操作パネルの挙動を再現した．また，タブレット端末の周囲に模擬対象製品の外観を（AR ゴーグル越しに）重畳表示するための 3DCG モデルを作成した(図 3)．実物の厳密な再現としては想定以上の達成度に至ったが，使用時の意識が専ら GUI に向くことから，模擬装置としてはタブレット端末単体でも高い再現度が得られた．

開発に際しては，依然人工呼吸器の需要が高く，機種によらず調達に時間を要した．このため，人工呼吸器の酸素供給情報と看護シミュレータの

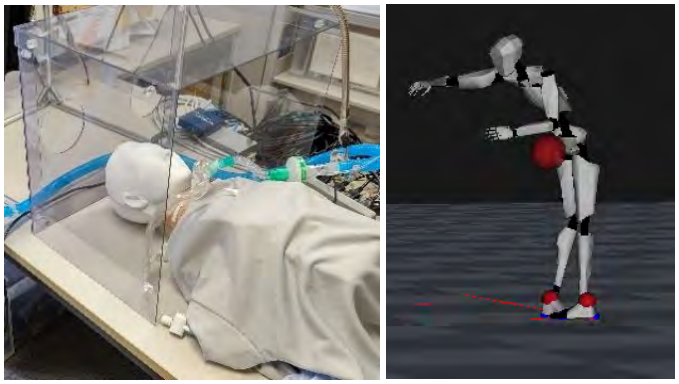


図 4　飛沫感染防護具存在下での気管内吸引手技の全身動作計測（右：シールドボックス設置の外観，左：動作計測データの可視化）

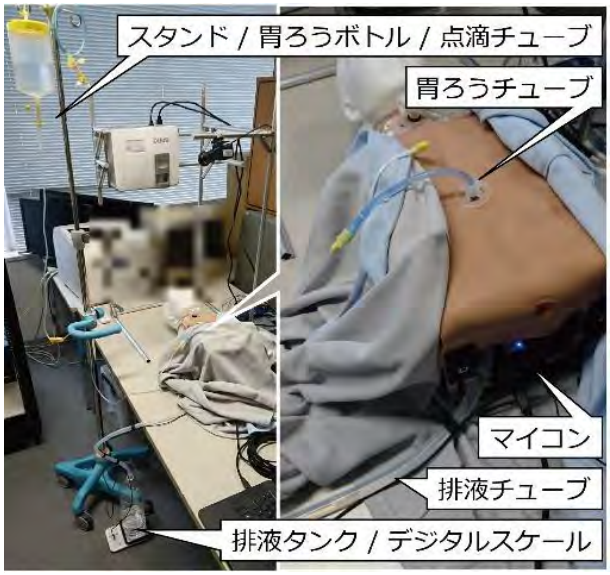


図 5　経管栄養訓練機能の実装

図 6　経管栄養訓練機能による患者モデルの表情変化

生体反応情報との連携および人工呼吸器操作の訓練上の記録のための仕様・アルゴリズムは策定できたものの，十分な実装には至っていない．

3.2. 飛沫感染防護器具の開発

飛沫感染防護器存在下での処置の訓練機能の評価および防護器具開発の知見を得るための実験として，市販のアクリル板を用いたシールドボックスを導入し，気管内吸引手技の全身動作計測を行った（図 4）．看護師経験のある共同研究者を対象として，様々な吸引方法（閉鎖式気管内吸引/開放式気管内吸引，シールドボックス無し/手窓側からアプローチ/開放部側からアプローチなど）の組み合わせを実施・分析し，手背移動距離などに着目して防護器具による処置の妨げ具合を定量的に評価した．そのうえで，効果的な感染防護の在り方を検討・提案した．この成果を学会にて口頭発表した [4]．これにより，より良い防護器具の開発・運用に資することとした目標はひとまず達成された．

3.3. 経管栄養訓練機能の開発

本シミュレータに経管栄養の訓練機能を導入するため，図 5 に示すように，腹部に胃ろうチューブを挿入するとともに，ベッドサイドに標準的なスタンド，胃ろうボトル，点滴チューブなどを配置した．胴体内部の胃ろうチューブ先端からは，別のチューブがスタンド基部へ伸びており，デジタルスケール（はかり）に載った排液ボトルに接続される．デジタルスケールからは，投与量そのものだけでなくその変化量が，本シミュレータの内蔵マイコンへ出力される．これにより，経管栄養における直接的な操作量である投与速度に基づいた評価が可能である．本シミュレータが呈示する生体反応（殊に表情）のアルゴリズムに，投与速度の寄与を設定することで，例えば胃食道逆流による誤嚥リスクが想定されるシナリオにおいて，あらかじめ設定された留意すべき水準より投与速度が早すぎた場合，苦痛度が増大し，図 6 に示すように，患者は徐々に苦痛の表情に変化していく．この成果を学会にて口頭発表した [5]．これにより，緩徐な投与を要する経管栄養の訓練において，途中経過を短縮して生体反応を呈示することで，訓練機会の充実に寄与しうるとした目標は十分に達成された．

3.4. 各機能の統合とユーザテストほか

人工呼吸器の模擬，飛沫感染防護手法の評価，経管栄養訓練機能の導入は，それぞれ独立に実施され，人工呼吸器模擬の遅れもあり，各機能の統合運用には至っていない．しかしながら，これま

でのところ各機能が干渉する要素はほとんど無いように留意して実装されたため，今後期待される大々的なユーザテストに備え，開発・整備を継続する．なお，本研究の開発段階におけるユーザテストは，計画通り看護師経験のある共同研究者の協力のもと実施した．また，少数人員での実験の記録のため，ドローンによる追尾撮影や配信機材の活用を試みた．

本研究が対象としている看護シミュレータは等身大マネキンをベースとしているが，派生プロジェクトとしてフル AR による看護シミュレータも開発されており[6]，生体反応の呈示や患者モデルの変化に関する技術を共有している．その知見も踏まえ，違和感を抑える患者モデルの生成手法に関する試みを口頭発表予定[7]である．

４．まとめ

本研究では，我々がこれまで開発してきた「手技に対する生体反応を呈示する看護シミュレータ」の技術を基盤として，人工呼吸，感染防護，痰吸引，経管栄養，体位変換など複数の訓練機能を備えた看護シミュレータを開発した．また，動作確認・試験運用としてのユーザテストを実施し，その成果を複数の学会にて発表した（または発表予定である）．

今後は，十分な実装・統合に至っていない人工呼吸器の模擬を完成させ，我々がコロナ禍以前に毎年行っていた看護師・看護学生を募ってのユーザテストにおいて，本シミュレータの実用評価および普及を図る．

謝辞

本研究の実施にあたり，中谷医工計測技術振興財団新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム(助成番号：2020Z041) のご支援をいただきました．ここに深く感謝の意を表します．

参考文献および発表論文

1) S. Komizunai et al., “An Interactive Endotracheal Suctioning Simulator which Exhibits Vital Reactions: ESTE-SIM,” International Journal of Automation Technology, Vol.14, No.3, pp.490―498, 2020.
2) 長内ほか，“気管内吸引技術における動作分析を用いた習熟度評価の検討　～前屈姿勢、手背移動、停留、NASA-TLX を指標として～”，日本小児呼吸器学会雑誌（採択済み）．
3) S. Komizunai et al., “An immersive nursing education system that provides experience of exemplary procedures from first person viewpoint with haptic feedback on wrist,” The 2020 IEEE/SICE International Symposium on System Integration, Mo2C.5, pp. 311 ― 316, 2020.
4) コリーほか，“手背移動量測定による気管内吸引時の飛沫感染防護方法の比較”，北海道?児保健研究会令和 3 年 総会・学術総会，講演 2，2021/05/22.
5) 小水内ほか，“気管内吸引，体位変換および経管栄養の訓練が可能な生体反応を呈する看護教育シミュレータ”，ロボティクス・メカトロニクス講演会 2021，2021/6/6―8.
6) 木村ほか，“触感を伴う拡張現実映像を用いた気管内吸引シミュレータのための気道模型の開発”，日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2020，2P1-F09，2020/5/27―30.
7) 木村ほか，“AR/VR 看護シミュレータのための馴染みや自然さを考慮した患者モデルの構成方法”，第 26 回日本バーチャルリアリティ学会大会，2021/09/12―14.（発表予定）

長期間の対外式人工心肺使用の安全性を改善する凝固管理手法の開発

研究責任者　名古屋大学医学部附属病院
救急科
病院助教授　　春日井　大介

１．はじめに

新型コロナウイルス感染（COVID-19)のパンデミック化が世界的な問題となってきている。COVID-19 が重症化した場合、人工呼吸管理だけでなく、対外式人工肺（ECMO)を用いて「肺を休める治療（lung rest)」が必要になる。一般的な急性肺炎と異なり、COVID-19 の場合は治療期間が長期化するため、いかに合併症を少なく治療を完遂できるかが重要である。ECMO による合併症は主に 1. 処置に伴うもの, 2. デバイス使用に伴う感染, 3. 凝固障害による出血・血栓形成である。ECMO ではカテーテルから人工肺までに血栓が形成することによる血栓症のリスクと、回路内凝固亢進による消費性凝固障害、全身での線溶系亢進による出血のリスクが発生する。従来式の ECMO の管理では抗凝固薬としてヘパリンの投与を行い、APTT などモニターとして使用しているが、凝固亢進状態や線溶亢進は評価できない。より詳細な凝固機能検査として、トロンボエラストメトリーが注目されている。しかし本検査は保険適応外であり、有効活用するためにはどのようなタイミングで使用すべきかを検討する必要がある。

２．内容

長期間の ECMO 使用の安全性の改善を評価するために、出血・血栓症リスクを既存の指標がどの程度有用かを調べた。名古屋大学医学部付属病院にて 2016 年~2020 年に入院した ECMO 症例を対象として、出血のリスクとなる血液検査結果の変動を調査した。

３．成果

123 症例を対象として抽出した。年齢 57 ±17 歳, VA-ECMO 102 例(83%)、VV-ECMO21 例(17%)であり、導入背景は、呼吸不全 22 例(18%)、ショック 60 例(49%)、ECPR 41 例(33%)だった。 ECMO 日数中央値は 7(3-11)日で、53 例(43%) が出血イベントを経験し、内容は輸血を要する刺入部出血(21 例:17 %)、脳出血 (8 例:6.5 %)、胸腔内出血 (7 例:5.7 %)だった。多変量ロジスティック回帰分析ではECMO日数は出血と関連した(OR: 1.17[1.08-1.28], p<0.001)が、導入背景との有意な相関は無かった(p=0.13)。多変量混合効果線形回帰モデルを用い、出血イベントの有無と検査値トレンドの交互作用を検討したところ、出血性合併症モニタリングの指標として、総/直接ビリルビン、ALP、γ-GTP、INR、CRP のトレンドは出血群と非出血群で有意な差を認めた(p for interaction <0.001)一方、APTT 比、血小板数、フィブリノゲン、D-dimer、FDP のトレンドは両群で有意な差はなかった。

４．まとめ

本研究により ECMO 患者の中で出血のハイリスク群の特徴が明らかとなり、既存の凝固機能検査では出血のリスクは予見できないことが示された。今後は出血のハイリスク群に対して、トロ

ンボエラストメトリー等を用いた詳細な凝固機能検査の有用性を調べる研究へと展開していく予定である。

参考文献および発表論文

日本集中治療医学会第5回北海道支部学術集会(2021年9月)にて成果報告予定

敗血症早期発見・管理のための非侵襲中心静脈血中酸素飽和度計測システムの臨床評価

研究責任者　公立小松大学　保健医療学部
医工学研究分野
准教授　　野川　雅道

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)による肺炎の重症化として「敗血症」となり集中治療室での治療が必要となる場合がある[1)]．敗血症はショックや臓器障害により死に至ることもあり，早期発見や発症後の管理が必要となる．敗血症は多臓器の感染症による代謝異常による静脈血酸素飽和度の低下などで確認される．

ここでは,敗血症の早期発見・管理に有効で，医師や看護師などの取り扱いが容易な非侵襲モニタとして近赤外光を用いた中心静脈血中酸素飽和度（SvO_2）モニタの臨床評価・研究開発を行うことを目的としている．

２．内容

COVID-19 による肺炎はパルスオキシメータ（動脈血中酸素飽和度計測装置）を用い早期発見が可能とされている．その中で重症化し敗血症になる患者が存在するが，定期的に敗血症スクリーニングである qSOFA（①呼吸数≧22/分，②精神状態の変化，③収縮期血圧≦100 mmHg のうち,2 つ以上を満たす)を実施する必要があり，患者が急増した際には対応が困難になる．そこで提案する SvO_2 モニタが利用できれば重症化の早期発見に寄与できると考えられる．

ここで提案する SvO_2 モニタは，近年，容易に入手可能となった小型分光器(C12880MA,浜松ホトニクス株式会社，日本）や広帯域 LED 光源を用いた小型化が可能な光計測機器として研究開発を進めている．

測定原理は，広帯域（600～850nm）の反射型光電脈波を計測し，そこで得られるスペクトルデータに対して，生体組織（散乱体）への適用が可能な光伝搬理論（光拡散理論など）を当てはめ，複数の未知の血液成分の体積分率を推定する方法である[2)]．ここで血液や組織などの光学特性（吸収・散乱係数）は既知であり，パルスオキシメータに使用される光電脈波の拍動成分だけでは無く，非拍動成分に含まれる静脈血酸素飽和度や組織内血液量など複数の未知パラメータ（体積分率）を最適化法により推定を行う．

３．成果・まとめ

健常者において SvO_2 計測が可能であったことから（n=4），慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの肺疾患患者を対象に実験を進めている．

謝辞

本研究の一部は，公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団「緊急支援 新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」より助成を受けたものであり，ここに記して謝辞とします．

参考文献および発表論文

1) Alhazzani, W., et al. (2021). Surviving Sepsis Campaign Guidelines on the

Management of Adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in the ICU. Critical Care Medicine, 49(3), e219-e234.
2) 野川雅道, 血中酸素飽和度の測定方法, 公開番号 2021-003299

胸骨圧迫中の電動ファン付き呼吸用防護具の保護効果に関する研究
（COVID-19 パンデミックに当たって）

研究責任者　名古屋大学医学部附属病院
救急科
病院講師　　後藤　縁

１．はじめに

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染症である新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、急速に拡大し世界的な脅威となっている。COVID-19 の診療において、医療従事者の感染を予防するため、適切な個人防護具（personal protective equipment; PPE）の着用が必須である。SARS-CoV-2 はエアロゾルによる感染も生じることが知られ、エアロゾルが発生する処置（aerosol-generating procedures; AGPs)を行う際は、空気感染予防策が必要である。心肺蘇生において重要な処置である胸骨圧迫も、AGPs の一つであることが示されている。

空気感染に対応する代表的な PPE は N95 マスクである。N95 マスク使用前には、フィットテストを行い、適切なサイズ・方法で着用するが、医療者の顔面や頸部は処置に伴ってしばしば動くため、マスクの形状や位置にずれが生じ得る。特に胸骨圧迫は、患者の胸部を 100-120 回/分の速さで 5-6cm 圧迫するという激しい身体活動が生じる処置であるため、N95 マスクのリークが発生するリスクは高まる[1),2)]。

一方、電動ファン付き呼吸用防護具（powered air purifying respirators; PAPR）は、電動ファンの送風によりマスク内を陽圧とするため、顔とマスクの間に隙間が生じた場合にもマスク内へ粉塵を漏れ込ませず、エアロゾルに対するより高い保護効果を有する PPE とされている。フィットテストが不要で使用に慣れていない者でも安全に使用できる点、再利用が可能な点も利点である。しかし、一般に PAPR は医療機器ではないため、医療従事者の使用を前提としておらず、医療処置中に保護効果が維持できるかについてのエビデンスは十分でない。特に胸骨圧迫は、前述の通り施行者の身体が激しく動くため、通常の作業以上にリークが生じる可能性はある。

そこで本研究では、COVID-19 患者の診療を念頭に、特に医療従事者の身体活動が大きい胸骨圧迫中の電動ファン付き呼吸用防護具（PAPR）の保護効果を検証すること、より安全かつ実診療に適した使用を明らかにすることを目的とした。

２．内容

単施設（名古屋大学医学部附属病院）におけるシミュレーション研究であり、参加者は PAPR を装着した状態で、シミュレータに対し胸骨圧迫を行った。目標症例数は 54 例とした。対象者は、当研究施設の医療従事者であり、1）20 歳以上である者、2）American Heart Association あるいは日本救急医学会の認定した一次あるいは二次救命研修を修了している者とした。

PAPR は、大風量形で半面形（ハーフマスク）の面体から構成される、tight-fitting PAPR の一種である BL-321S（興研株式会社、日本）を用い、フィルタは BLA-62 を使用した（図 1)。保護効果の指標としては、simulated workplace

protecting factor; SWPF を用いた。環境中の粒子数をマスクの内側の粒子数で割ったものを Fit Factor と呼び、その値が高い程、呼吸用保護具の保護効果が高いことを示す。胸骨圧迫を行っている間の Fit Factor を SWPF と定める。SWPF 測定は、労研式マスクフィッティングテスター MT-05U 型（SIBATA、日本）を使用し、環境中（マスクの外側）と、マスク内側の粒子数を測定した。

図 1. PAPR（BL-321S およびフィルタ）

参加者は、研究者の監督のもと、PAPR を装着し、装置が正常に動作することを確認した後、 以下に示す間隔でシミュレータを用いた胸骨圧迫を行った。

＜シミュレーションにおける胸骨圧迫の間隔＞
胸骨圧迫 2 分→休憩 4 分→胸骨圧迫 2 分→休憩 4 分→胸骨圧迫 2 分

参加者は、シミュレーション終了後に、PAPR の着脱の簡単さ、快適さや呼吸困難感、視野や会話に妨げがあるか等についての質問（アンケート）に 5 段階で回答した。

主要評価項目は、胸骨圧迫セッション中に保護効果が低下（即ち SWPF が 500 未満に低下）した参加者の割合とした。副次評価項目は、機器のトラブル（装着している PAPR が外れる、故障する等）、参加者による着脱の簡単さ、装着中の快適さの評価とした。

3. 成果

—結果—

2021 年 2 月から同 3 月にかけ、54 名が研究に組み入れられた。参加者の年齢の中央値は 34 歳（IQR 27-41）、女性が 39%（21 名）であった。BMI の中央値は 21.4（IQR 20.0-24.1）。参加者の職種としては、医師が 57%（31 名）、看護師が 33%（18 名）、その他が 9%（5 名）であった。

主要評価項目の結果を表 1 に示す。78%（42 名）の参加者において、胸骨圧迫セッション中の PAPR の保護効果が低下した（即ち SWPF が 500 未満に低下した）。保護効果が低下した割合は、1 回目、2 回目、3 回目のセッションにおいて、それぞれ 72%（39 名）、56%（30 名）、46%（25 名）であった。

副次評価項目について、機器のトラブル（装着している PAPR が外れる、故障する等）を生じた例はなかった。シミュレーション終了後に行ったアンケート結果を表 2 に示す。PAPR の着脱が困難だと感じた参加者はほとんどいなかった一方、参加者の 24%（13 名）が声を出してコミュニケーションをとることが難しいと感じ、20%（11 名）は他の人の声が聞こえにくいと回答した。しかし大部分の参加者（85%）は、実際の蘇生の際に PAPR を使用できそうだと回答した。

表 1. 主要評価項目および副次評価項目，*結果は n(%)で表記.

	保護効果が低下した割合	SWPF*
全体	78%	4,304（685-16,191）
1 回目のセッション	72%	2,749（409-9,275）
2 回目のセッション	56%	4,679（773-20,173）
3 回目のセッション	46%	6,291（1,117-21,011）

表 2. 質問（アンケート）への回答，*結果は n(%)で表記.

質問	5 段階での回答*		
	1-2	3	4-5
1. PAPR の着衣（着ける操作）は難しいと感じましたか？	44 (81)	8 (15)	2 (4)
2. PAPR の脱衣（外す操作）は難しいと感じましたか？	53 (98)	1 (2)	0
3. 視野は妨げられましたか？	41 (76)	5 (9)	8 (15)
4. 呼吸が苦しいと感じましたか？	43 (80)	2 (4)	9 (17)
5. 不安や焦りを感じましたか？	45 (83)	6 (11)	3 (6)
6. 会話（声を出してコミュニケーションをとること）が難しいと感じましたか？	33 (61)	8 (15)	13 (24)
7. 他の人の声が聞こえにくいと感じましたか？	37 (69)	6 (11)	11 (20)
8. 顔や皮膚に痛みを感じましたか？	46 (85)	5 (9)	3 (6)
9. 胸骨圧迫がしにくいと感じましたか？	45 (83)	3 (6)	5 (9)
10. 実際の蘇生の際に使用できそうだと思いましたか？	1 (2)	7 (13)	46 (85)

―考察―

これまでに、胸骨圧迫中の tight-fitting PAPR の保護効果についての報告はないため、私たちはその効果、特に胸骨圧迫中の身体の動きが保護効果に与える影響について検証した。Tight-fitting PAPR は、胸骨圧迫中に十分な保護効果を維持できず、多くの参加者でシミュレーション中の SWPF が 500 未満に低下するという結果であった。Tight-fitting PAPR を使用した場合、SWPF の中央値は 4,304 と高い値ではあったが、胸骨圧迫による激しい動きは、マスクと顔の間に緩みを生じさせ、リークが発生することで十分な防護を妨げることが示された。

一方、装着している PAPR が想定外に外れたり、故障したりするようなトラブルは生じなかった。これには tight-fitting PAPR が、外付けのバッテリーやホースなどを持たない、シンプルな構造であることが寄与していると考えられた。また tight-fitting PAPR は着脱が容易であり、本研究のアンケート調査でも PAPR の着脱が困難だと感じた参加者はほとんどいなかった。過去の研究から、PPE を脱衣する際にコンタミネーションが生じることが多く、感染が起こることが知られているため、着脱の簡便さは利点である。

アメリカ心臓協会は、COVID-19 の感染が疑われる患者に対する心肺蘇生についてのガイドラインを公表している [3)]。その中で「医療従事者は、空気感染および飛沫感染のいずれにも対応できる PPE を装着して、蘇生にあたるべき」とされているが、具体的な PPE の種類やレベルについては言及されていない。今後は、心肺蘇生を行う際の適切な PAPR についても議論がされるべきである。

4．まとめ

Tight-fitting PAPR は、胸骨圧迫中に十分な保護効果を維持できなかった。この研究結果は、tight-fitting PAPR の保護効果は、身体の激しい動きにより影響を受けることを示した。COVID-19 をはじめとした空気感染を生じる疾患が疑われる患者に心肺蘇生を行う際、医療従事者が用いる呼吸保護具のレベルについて、ガイドラインの改訂やそのためのさらなる研究が必要である。

発表論文

本研究結果は、以下の論文に発表した。

Am J Emerg Med. 2021 Jun 7;49:172-177.
doi: 10.1016/j.ajem.2021.06.012.

参考文献

1) Shin H, Oh J, Lim TH, Kang H, Song Y, Lee S. Comparing the protective performances of 3 types of N95 filtering facepiece respirators during chest compressions: A randomized simulation study. Medicine (Baltimore). 2017;96(42):e8308. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000008308.

2) Hwang SY, Yoon H, Yoon A, Kim T, Lee G, Jung KY, et al. N95 filtering facepiece respirators do not reliably afford respiratory protection during chest compression: A simulation study. Am J Emerg Med.2020;38(1):12-7. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.03.041.

3) Edelson DP, Sasson C, Chan PS, Atkins DL, Aziz K, Becker LB, et al. Interim Guidance for Basic and Advanced Life Support in Adults, Children, and Neonates With Suspected or Confirmed COVID-19: From the Emergency Cardiovascular Care Committee and Get With The Guidelines-Resuscitation Adult and Pediatric Task Forces of the American Heart Association. Circulation. 2020;141(25):e933-e43. https://doi.org/10.1161/circulationaha.120.047463.

LAMP 法による増幅判別のための可視化薬の検討とその精度管理に関する研究

研究責任者　岐阜医療学大学
保健科学部臨床検査学科
准教授　　永井　慎

研究報告内容が特許出願中の内容に関わることから報告なしといたします。(事務局)

非接触酸素飽和度測定を組み込んだ感染者スクリーニングシステムの開発

研究責任者　東北大学大学院工学研究科
技術社会システム専攻
准教授　　杉田　典大

１．はじめに

ウイルス感染症の拡大予防には、簡便かつ非接触な方法で感染の可能性のある人をスクリーニングすることが重要である。ウイルスに感染しているかどうかを判断する際には、PCR 検査のような遺伝子検査が必要であるが、ウイルス感染の影響が呼吸器系に現れる場合、血中酸素飽和度（SpO_2）にも兆候が現れる可能性が高い。もし、これを非接触で手軽に計測することができれば、ウイルス感染症のスクリーニングに用いることが可能である。SpO_2 は、体内に十分な量の酸素が行き届いているかどうかを定量的に確かめることのできるパラメータであり、動脈血中の総ヘモグロビンのうち酸素と結合したヘモグロビンの占める割合を表す。

我々のグループでは、これまで、非接触で生体の状態をモニタリングするための手法として、ビデオ映像から抽出できる映像脈波（videoplethysmography: VPG）の研究を行ってきた[1)-3)]。前述の SpO_2 は指尖部などに装着したセンサで得られる光電容積脈波から求められるため、原理的には VPG を用いて非接触に SpO_2 を推定することが可能である。

本研究の目的は、VPG の原理を利用して、計測対象者の SpO_2 を非接触で精度よく測定するための手法を確立することである。この手法が確立できれば、発熱を調べるためのサーモグラフィ検査と組み合わせることで、感染者のスクリーニング精度を向上させることができると考えられる。VPG を用いて SpO_2 を計測しようとする試みは、これまでも報告されている[4)]。しかし、多くの場合、測定部位とカメラの距離が極めて近かったり周辺光が安定していたりするなど、理想的な環境下で計測を行っていた。また、SpO_2 の推定値を算出する際に、接触式センサで得られる真値を利用した補正が必要な場合があり、これらの手法をそのまま感染者のスクリーニングに用いることはできない。さらに、VPG の生成に関しては、身体全体が心拍に同期して揺れることで生じる ballistocardiogram 由来成分と、皮下に含まれるヘモグロビン変化に応じて生じる photoplethysmogram 由来成分が混在しているとされているが、測定原理から明らかなように、ballistocardiogram 成分は SpO_2 の推定精度を低下させる要因として働く可能性があるため、除去することが望ましい。また、近年の研究では、皮下組織の機械的変形が VPG の生成に大きく関与している可能性があるとする報告もあり[5)]、VPG のみでは SpO_2 を測ることはできないのではないかとしている論文も存在する[6)]。これらのことから、SpO_2 を非接触で精度よく計測するためには、これらの影響因子を特定し、除去する手法の確立が必要である。

本研究では、映像から SpO_2 を推定する手法の 1 つである Shao らの先行研究[7)]に着目した。この手法では、VPG の脈動成分を画像の平均輝度である

直流成分を使って正規化しており、皮膚に対する光の当たり方の違いなどに対してロバストな計測が可能であると考えられる。一方で、SpO_2 の算出には個人毎に真値を使った補正が必要であるという問題があるため、本研究ではこの課題を解決することを目指し、VPG による SpO_2 推定で生じるバイアス誤差の原因を調査した。

２．原理と実験

２．１　原理

一般に、SpO_2 を測定するためには接触式のパルスオキシメータを用いて、赤色光と近赤外光の LED からなる発光部と透過光を測定する受光部の間に指を挟むことで測定を行う。酸化ヘモグロビン（HbO_2）と還元ヘモグロビン（Hb）に対する光の波長とモル吸光係数の関係は図１のようになっており、赤色光（640–780nm）でのモル吸光係数は Hb が HbO_2 よりも大きい一方、近赤外光（780nm–2500nm）でのモル吸光係数は HbO_2 の方が Hb よりも大きい。したがって、血液中の酸素濃度が低下すると HbO_2 濃度が低下し、赤色光と近赤外光の吸光度の変動比である SpO_2 が変化する。

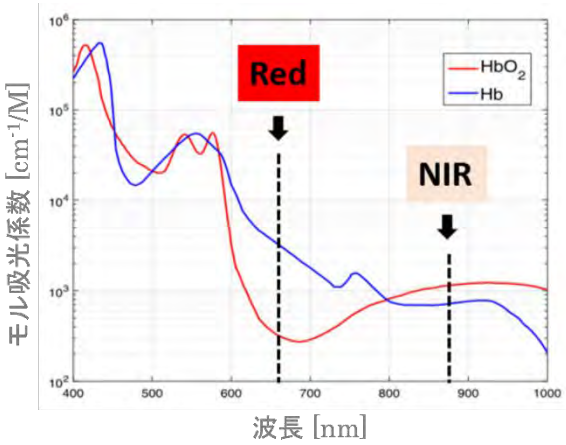


図１：光の波長とモル吸光係数

次に、VPG から SpO_2 を推定する方法について説明する。皮膚に強度 I_{in}、波長λの光を入射したときの反射光強度を $I_{out}(\lambda)$とすると、Lambert–Beer の法則[8]より、吸光度 A_λは以下で表される。

$$A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I_{out}(\lambda)}{I_{in}}\right) \quad (1)$$

ここで、拍動によって血管径がΔd だけ厚くなることで吸光度がΔA_λだけ増加し、反射光強度が$\Delta I_{out}(\lambda)$だけ減少したと考えると、以下の式が成り立つ。

$$A_\lambda + \Delta A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I_{out}(\lambda) - \Delta I_{out}(\lambda)}{I_{in}}\right) \quad (2)$$

(1)式と(2)式の差分をとり、マクローリン展開による近似を用いることで、以下の式が導かれる。

$$\Delta A_\lambda = -\log_{10}\left(\frac{I_{out}(\lambda) - \Delta I_{out}(\lambda)}{I_{in}}\right) \cong \frac{\Delta I_{out}(\lambda)}{I_{out}(\lambda)} \quad (3)$$

(3)式の分母と分子はそれぞれ、反射光の DC 成分と AC 成分（図２）に相当するので、以下のように表すことができる。

$$\frac{\Delta I_{out}(\lambda)}{I_{out}(\lambda)} = \frac{AC_\lambda}{DC_\lambda} \equiv nAC_\lambda \quad (4)$$

(3)式と(4)式は、波長λの光を入射した時の脈動（血管径の変動）による吸光度の変動ΔA_λが、反射光の変動成分 AC_λを直流成分 DC_λで正規化した nAC_λで近似可能であることを示している。ここで、異なる 2 つの波長λ_1、λ_2 における nAC_λの比である正規化 AC 比 R_{nAC} を、以下のように定義する。

$$R_{nAC} \equiv \frac{nAC_{\lambda_1}}{nAC_{\lambda_2}} = \frac{AC_{\lambda_1}/DC_{\lambda_1}}{AC_{\lambda_2}/DC_{\lambda_2}} \quad (5)$$

さらに、波長λの光に対する Hb 及び HbO_2 のモル吸光係数をそれぞれ$\varepsilon_{Hb}(\lambda)$、$\varepsilon_{HbO_2}(\lambda)$とすると、Lambert–Beer の法則及び SpO_2 の定義から、以下の関係式が導かれる。

$$SpO_2 = \frac{\varepsilon_{Hb}(\lambda_1)-\varepsilon_{Hb}(\lambda_2)R_{nAC}}{\varepsilon_{Hb}(\lambda_1)-\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_1)+\{\varepsilon_{Hb}(\lambda_2)-\varepsilon_{HbO_2}(\lambda_2)\}R_{nAC}} \quad (6)$$

以上より、異なる 2 波長λ_1、λ_2における VPG から算出した R_{nAC} を(6)式に代入することで、SpO_2 の値を推定することができる。ただし、VPG を用いて SpO_2 を推定する場合には、$\varepsilon_{Hb}(\lambda)$や$\varepsilon_{HbO_2}(\lambda)$に誤差が生じるため、$SpO_2$ の真値を使って補正を行う必要がある。

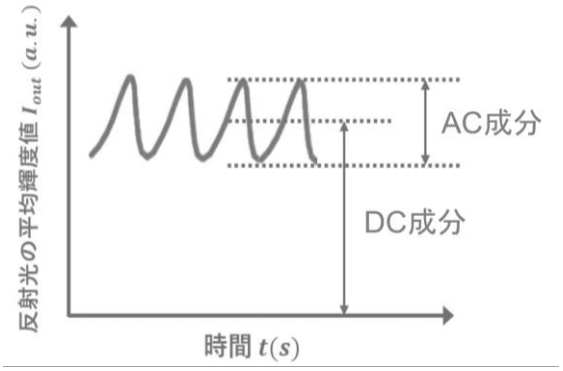


図２：AC 成分と DC 成分

２．２　実験環境

前述した手法の精度を確認するために、被験者 3 名を対象とした実験を実施した。図３に、実験のセットアップを示す。

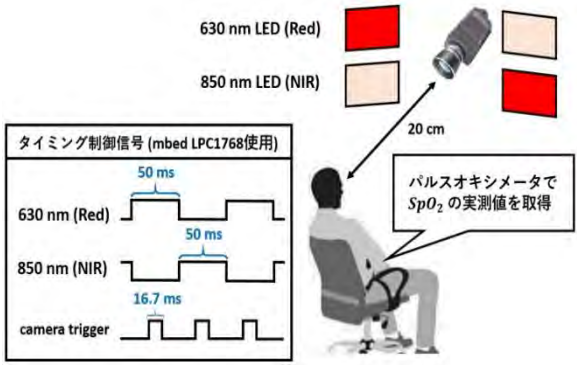


図３：実験セットアップ

実験では、波長 630nm の赤色 LED と波長 850nm の近赤外 LED を 50ms 毎に交互に光らせることによって、異なる 2 波長の光を被験者の顔に照射できるようにし、20cm 離れた位置のビデオカメラ（浜松ホトニクス社製、ORCA-Flash4.0 V3）で撮影を行った。本実験におけるカメラの撮影設定を表 1 に示す。LED 点灯及びカメラ撮像のタイミングは、マイクロコンピュータ（mbedLPC1768）を用いてトリガー信号を入力することにより制御した。また、実験は、環境光の影響をなくすため暗室内で実施した。

表１：カメラの撮影設定

画素数	1276×1280 pixel
フレームレート	20 fps
露光時間	16.7 ms
カラー	モノクロ
保存形式	16 bit tiff

本実験は、東北大学大学院工学研究科人を対象とする研究に関する倫理委員会の承認を得て実施した。

２．３　解析

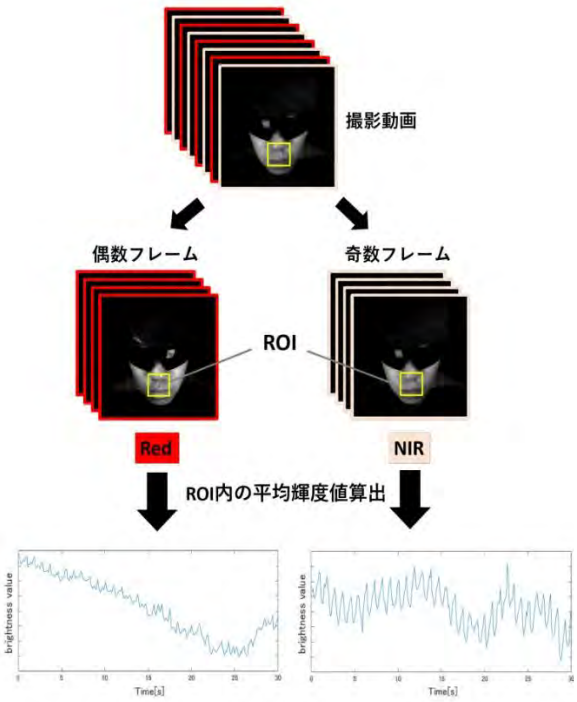


図４：赤色光(Red)及び近赤外光(NIR)による VPG 取得

図４のように、取得した画像群を偶数フレームと奇数フレームとに分けることで、赤色光（Red）を照射した顔画像と近赤外光（NIR）を照射した顔画像とを分離する。その後、画像内で関心領域（ROI）を設定し、各フレームにおける ROI 内のピクセルの平均輝度値を算出することで異なる波長の照射光による VPG を取得する。

続いて、人間の心拍動が 1 Hz であることを考慮して、カットオフ周波数 2Hz を持つ 3 次のローパスバタワースフィルタを VPG 信号に適用する。その後、10 秒毎に時間窓で切り出し、各窓内における AC 成分の平均値を DC 成分の平均値で除することで正規化した変動成分 nAC_λを求める。この処理を赤色光 VPG と近赤外光 VPG それぞれに行うことで、異なる 2 波長λ_1 とλ_2 における nAC_λが求まり、さらに正規化 AC 比 R_{nAC} の値が求まるため、10 秒ごとに SpO_2 の推定値を算出することができる。

3．結果

3．1　実験 1

実験 1 では、前述の手法による VPG からの SpO_2 推定精度を確認した。実験では途中で息止めを行い、意図的に SpO_2 を変化させてもらった。

図 5 に、ある被験者の SpO_2 推定値と実測値の相関図を示す。この結果から分かるように、推定値は実測値と相関の関係があり（相関係数 0.90）、推定した SpO_2 が実際の血中酸素飽和度を反映していることが示された。一方、推定値にはバイアス誤差がのっており、この被験者の場合は約 4.4%のバイアス誤差が生じていた。他の被験者においても、同様の傾向がみられ、相関係数は平均で約 0.74、バイアス誤差は平均で約 4.5%であった。

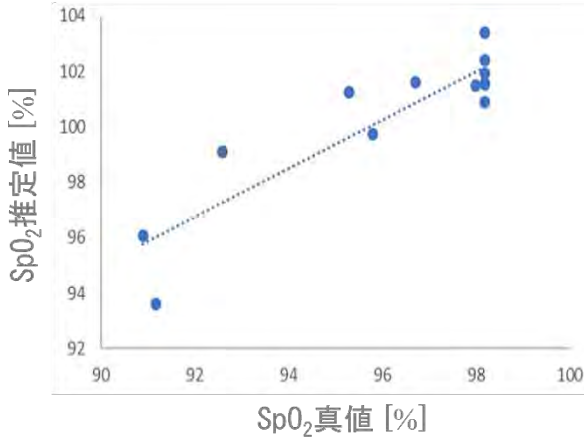


図５：ある被験者の SpO_2 の真値と推定値

3．2　実験 2

実験 2 では、実験 1 でみられた誤差について、被験者の顔における ROI の範囲と照射する LED の強度をそれぞれ変えた場合のバイアス誤差の変化を調べた。

図 7 は、ある被験者について、3 つの異なる ROI（図 6）から得られた VPG を使って SpO_2 を推定した場合のバイアス誤差である。この結果より、鼻と口のみを含む領域よりも顔の下半分を全て含む領域を ROI として使った方が、誤差が小さくなることが分かる。これは、部位の違いも関連をしているが、ROI に含まれるピクセル数が大きく関係している可能性がある。すなわち、ROI が大きいほど得られる情報量が多くなり、結果として VPG の S/N が改善されると考えられる。

図６：ROI の違い

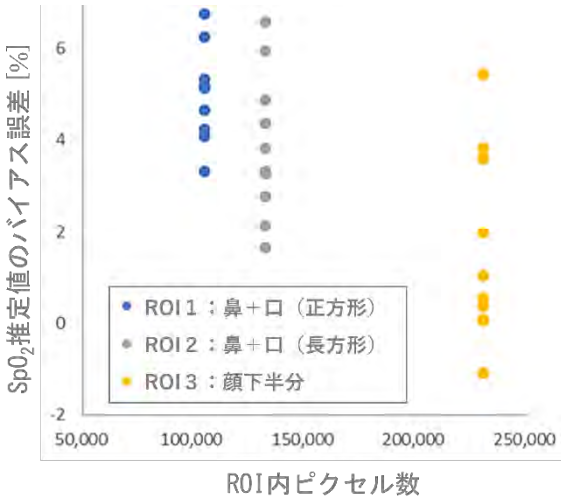


図７：ROI の違いと SpO_2 推定のバイアス誤差

一方で、ROI に含まれるピクセル数が大きくなるほどバイアス誤差のばらつきが大きくなることが分かった。これは、ROI を大きくすることで、顔の中で照射光が十分に当たっていない箇所（顔の陰影）や顔以外の背景の一部を ROI に含めてし

まう可能性が高まり、被験者の顔が僅かに動いてROI にこれらの領域が含まれた際に精度が大きく低下するためであると考えられる。

次に、LED 照射光の強度を調整して、ROI 内の平均輝度を変えたときのバイアス誤差の変化を示したものを図８に示す。ROI は、鼻と口（正方形）の領域で統一した。この結果から分かるように、ROI 内の平均輝度の違いによって、バイアス誤差の大きさやばらつきに大きな差はみられず、皮膚に当たる光の強さはバイアス誤差に大きな影響を及ぼさないことが確認できた。これは、今回用いた手法において、VPG の脈動成分を画像の平均輝度である直流成分を使って正規化している効果であると考えられる。

一方、今回の実験では LED 照射光の強度はいずれの被験者に対しても同じように変化させているが、図８の結果では、被験者によってはROI 内の平均輝度が異なっている場合がある。この原因としては、ROI 内の平均輝度が被験者の皮膚の色や鼻の形状などによって影響を受けるためではないかと考えられる。

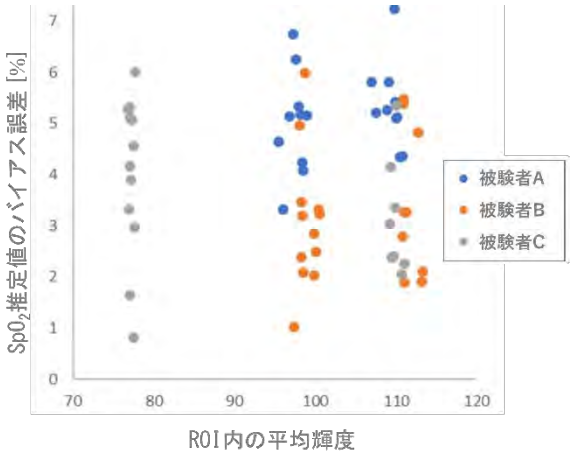


図８：ROI 内の平均輝度と SpO_2 推定のバイアス誤差

４．まとめ

本研究では、ビデオカメラから得られる顔の映像を解析することにより、完全非接触な計測で SpO_2 を推定する手法を確立することを目的とした。

VPG によって得られる SpO_2 推定値をパルスオキシメータから得られる SpO_2 真値と比較した結果、両者の間には相関がみられるが、バイアス値に誤差が生じていることが分かった。このバイアス誤差に関連する要因を調べるため、VPG を取得する際の ROI と、顔に照射する LED 光強度を変化させる実験を実施した結果、ROI 内の面積が大きくなるほどバイアス誤差は小さくなるが、逆にばらつきが大きくなることが分かった。さらに、照射する LED 光強度の違い自体は、バイアス誤差にほとんど影響を与えないことが分かった。

最後に、本研究における今後の課題について述べる。1 つ目の課題は、適切な ROI 選択手法の確立と、照射光源の見直しである。今回の実験では、ROI を大きくすることでバイアス誤差を低減させられる可能性を示したが、逆に誤差のばらつきが大きくなってしまった。これは、前述したように、顔の陰影が大きく関連している可能性がある。特に、今回のようにビデオカメラの周辺４箇所に面型の LED 照明を配置すると、赤外光と近赤外光の VPG において僅かに陰影の差が生じてしまう。このため、今後はリング型の LED などを用いて、この差をなくすようにすべきである。

2 つ目の課題は、被験者の動きに強い手法の確立である。VPG はその原理から、被験者が動くと波形が乱れてしまい、結果として SpO_2 の推定精度が低下してしまう可能性がある。動きによって VPG 波形が乱れてしまうのは、ROI 内に含まれる皮膚領域が変化してしまうことが原因であると考えられるため、ROI 内に含まれる皮膚領域ができる限り変化しないような領域追跡手法を適用し、SpO_2 の精度向上を図るべきである。また、フレーム毎に画像の特異値分解を行って輝度特徴の近い領域同士を自動的に抽出するアルゴリズム [9]など、顔認識に依らない対象領域選択手法の適用なども検討すべきである。

3 つ目の課題は、照明などの周囲光の影響抑制である。本実験では、周囲光の影響を考慮しないで済むように暗室で撮影した被験者の顔映像を使用したが、感染症のスクリーニングなどで非接

触 SpO_2 計測を行う場合には、周囲光の影響を考慮しなければならない。この課題に対しては、映像内の背景情報を利用する等の対処法が考えられる。

謝辞

本研究の実施に際し、研究助成を頂きました公益財団法人中谷医工計測技術振興財団に深く感謝致します。

参考文献

1) N. Sugita *et al.*, “Techniques for estimating blood pressure variation using video images,” Proc. the 37th Ann. Int. Conf. IEEE EMBS, pp. 4218–4221, 2015
2) N. Sugita *et al.*, “Noise reduction technique for single-color video plethysmography using singular spectrum analysis,” IEEE J. Biomed. Health Inform., 24(6), pp.1788–1795, 2020
3) N. Sugita *et al.*, “Contactless Technique for Measuring Blood-Pressure Variability from One Region in Video Plethysmography,” J. Med. Biol. Eng., 39(1), pp.76–85, 2019
4) S. Zaunseder *et al.*, “Cardiovascular assessment by imaging photoplethysmography – A review,” Biomed. Eng. Biomed. Tech., 63(5), pp. 617–634, 2018
5) A. A. Kamshilin *et al.*, “A new look at the essence of the imaging photoplethysmography,” Scientific Rep., 5, Art. no. 10494, 2015
6) A. A. Moco *et al.*, “New insights into the origin of remote PPG signals in visible light and infrared,” Scientific Rep., 8, Art. no. 8501, 2018
7) D. Shao *et al.*, “Noncontact monitoring of blood oxygen saturation using camera and dual-wavelength imaging system,” IEEE Trans. Biomed. Eng., 63(6), pp.1091–1098, 2016
8) 小坂誠 ほか “パルスオキシメータの原理,” 日本集中治療医学会雑誌, 23(6), pp.625–631, 2016
9) W. Wang, *et al.*, “Full Video Pulse Extraction,” Biomed. Opt. Exp., 9(8), 2018

発表論文

佐々木颯馬，吉澤誠，杉田典大，八巻俊輔，本間経康，市地慶“顔映像を用いた非接触式血中酸素飽和度測定法,”計測自動制御学会東北支部第 331 回研究集会

新型コロナウイルス抗体検査による侵襲性の高い処置における術前スクリーニングに関する研究
―発熱外来（帰国者・接触者外来）受診者、COVID-19 入院患者での成績をコントロールに

研究代表者　三田市民病院
事業管理者・院長　荒川　創一
研究分担者　同上
副院長　中村　　晃
臨床検査科次長　岩井　智行
同　　係長　中務　雄介

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、無症状病原体保有者が少なくないとされ、気道に保有している場合、手術を受ける患者の気管内挿管時や、上部消化管内視鏡処置時などにエアロゾルが発生し、本ウイルスが環境に拡散して手術室・処置室が汚染あるいは医療従事者が感染を被る懸念がある。そのことを回避するため、術前検査でウイルス保有の有無を簡便にスクリーニングする方法が求められる。

本研究は、手術等の侵襲的な処置が予定されている患者において、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の血中抗体を測定することの診断的意義を検討し、ひいてはその感染伝播防止に資することをその目的とする。これらを研究に当たって、発熱外来（帰国者・接触者外来）受診者と COVID-19 入院患者のそれら抗体の結果をコントロールとしてあわせて検討する。

２．対象及び方法

【対象】

Group1 として、三田市民病院で①麻酔科管理手術（気管内挿管をするか又はする可能性がある手術、言い換えればエアロゾルが発生するリスクがある手術）および②局所麻酔下の手術（前記リスクがない手術）を受ける患者、③緊急消化管内視鏡検査・治療を受ける患者、④緊急心臓血管カテーテル検査・治療を受ける患者を対象に、①、②では、手術予定日の概ね 1～2 週間前に採血した血液を用い、③、④では術直前に採血した血液を用いて血中の SARS-CoV-2 抗体(下記 5 種)を測定した。Group2 として、発熱外来（帰国者・接触者外来）受診者を対象に、受診時の採血を用いて血中の SARS-CoV-2 抗体(下記 5 種)を測定した。Group3 としては COVID-19 患者の入院時採血の血液を用いて血中の SARS-CoV-2 抗体(下記 5 種)を測定した。

また、Group1、2 のすべての患者に対して入院時に鼻腔拭い液中抗原定量検査（以下抗原検査）を実施した。

【対象患者数：901 名】

Group1（以下、術前患者）：540 名

Group2（以下、発熱外来受診者）：288 名

Group3（以下、COVID-19 入院患者）：73 名

【方法：抗体検査】

Ⅰ）メーカー：Sysmex 株式会社

分析器：HISCL-5000

試薬：1）HISCL SARS-CoV-2 S-IgM 試薬

2）HISCL SARS-CoV-2 S-IgG 試薬

3）HISCL SARS-CoV-2 N-IgM 試薬

4）HISCL SARS-CoV-2 N-IgG 試薬

検体：血清

以下、S-IgM、S-IgG、N-IgM、N-IgG と表記。

Ⅱ）メーカー：Roche 株式会社

分析器：Cobas8000(602)

試薬：Elecsys®Anti-SARS-CoV-2 RUO

検体：血清

以下、N-IgM/IgG と表記

Sysmex 社製においては、N 抗原と S 抗原に対するそれぞれ IgG 抗体、IgM 抗体の計 4 種類であり、Roche 社製は、SARS-CoV-2 の N 抗原に対する IgG/IgM 抗体を検出し、抗体値は全部で 5 種類得られることとなる。

【方法：抗原検査】

Ⅰ）メーカー：富士レビオ株式会社

分析器：ルミパルス G-1200

試薬： SARS-CoV-2 Ag

検体：鼻腔ぬぐい液

Ⅱ）メーカー：ベックマンコールター株式会社

分析器：GeneXpert

試薬：Xpress SARS-CoV-2「セフィエド」

検体：鼻腔ぬぐい液

富士レビオ社抗原定量検査において、1.0~10.0pg/mL の場合は判定保留とし、ベックマンコールター社 GeneXpert にて、RT-PCR を用い最終判定した。

３． 結果

1） 抗体陽性率

全被検者の背景別の抗体陽性率を表 1 に示す。術前患者の抗原陽性者はなかったのに対し、発熱外来患者では、抗原陽性と判定された患者は 13 名であった。また、抗原陰性者の抗体陽性率は、

表１：抗体陽性率

	抗原検査	抗体検査		
		全体	(+)	%
術前患者	(−)	540	11	2%
	(+)	0	0	0%
発熱外来患者	(−)	275	3	1%
	(+)	13	4	31%
COVID19入院患者	(+)	73	20	27%

無症状である術前患者では、2%と低頻度であり、発熱や呼吸器症状のある発熱外来患者で抗原陰性者の抗体陽性率も 1%と同様に低い水準であった。しかし、発熱外来受診者で抗原陽性の患者および、COVID-19 入院患者ではともに抗体陽性者は、約 30%と高い水準を示した。（表１）

2） 抗体陽性者の陽性パターン

全 901 名中の抗体陽性者 38 名における抗体種別の陽陰性を表 2 に示し、そのパターン（type）について解析した。

38 名におけるそのパターン（type）は、11 通りとなった。

表２：抗体陽性者の各種抗体結果

抗体名	S-IgM	S-IgG	N-IgM	N-IgG	N-IgM/IgG	患者数
type	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	13
	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	6
	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	5
	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	3
	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	3
	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	2
	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	2
	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1
	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	1
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	1
	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	1
陽性率	64%	21%	12%	52%	60%	38

抗体種別に見ると S-IgM 陽性が最も多く、抗体陽性者のうち 64%の患者で陽性であった。次に、N-IgM/IgG が 60%の患者で陽性であり、試薬メーカーや測定機器、原理が異なるが同様に N 抗原に対する抗体である N-IgG が 52%と近い値を示した。一方、N-IgM については N-IgM/IgG 、N-IgG とは乖離し、12%と全抗体の中で最も低い値を示した。

3） 抗原陽性者の抗体陽性時期に関して（図 1）

発熱外来患者のうちの抗原陽性かつ抗体陽性

であった 4 名及び、COVID-19 入院患者で入院時抗体検査にて陽性であった 20 名、計 24 名の抗体陽性検査日が発症日から数えて何日目であったかを参考値として解析した。その結果、S-IgM は 5.5~9.5 日、S-IgG は 9.0~15.0 日、N-IgM は 3.5~13.3 日、N-IgG は 5.3~11.0 日、N-IgM/IgG は 5.3~11.0 日であった。これに対し、COVID-19 入院患者で入院時の抗体検査が陰性の 53 名の発症日からの経過日数は、3.5~6.0 日であった。

これらの日数は参考値ではあるが、発症日から抗体陽性が確認された日までの経過日数も、N-IgG と N-IgM/IgG は似通っていたが、N-IgM については相違がみられた。

4. 考察

術前患者のスクリーニングにおいて抗原陰性者での抗体陽性率は 2%であり、発熱や呼吸器症状のある発熱外来患者においても抗原陰性者での抗体陽性率は 1%と共に低い水準であった。この結果は、2020 年 12 月 14 日から同 26 日にかけて行われた全国の一般対象者での調査結果[1]と大きな差はなかったことから今回の抗体検査の陽性率については概ね正確な実態把握ができていると考える。その上で、抗原陽性者の抗体陽性率は、発熱外来患者、COVID-19 入院患者に関わらず約 30％と高く、抗体検査が COVID-19 の診断の補助になる可能性は高いといえる。

各種抗体別にみた COVID-19 診断に有効な抗体の検討では、発熱外来受診者で抗原が陽性であった患者及び COVID-19 入院患者において 5 種類の抗体を、同一検体を用いて検査し、検査日と発症日との間の日数を計算することで各種抗体の陽性までにかかる日数の参考値として整理してみた。

N 抗原については、シスメックス社製の N-IgG が 5.3~11.0 日であり、Roche 社製の N-IgM/ IgG が陽性となっている日までの日数幅が同じでかつ、平均日数と中央値に大きな差がなかったのに対し、N-IgM は陽性となっている日までの平均日数が 6.5 日でその中央値が 7.8 日と全項目の中で最短ではあったが、3.5~13.3 日とばらつきが大きかった。通常、感染症では感染初期に IgM の上昇がみられるが、表 2 の結果からも必ずしも IgM からではなく

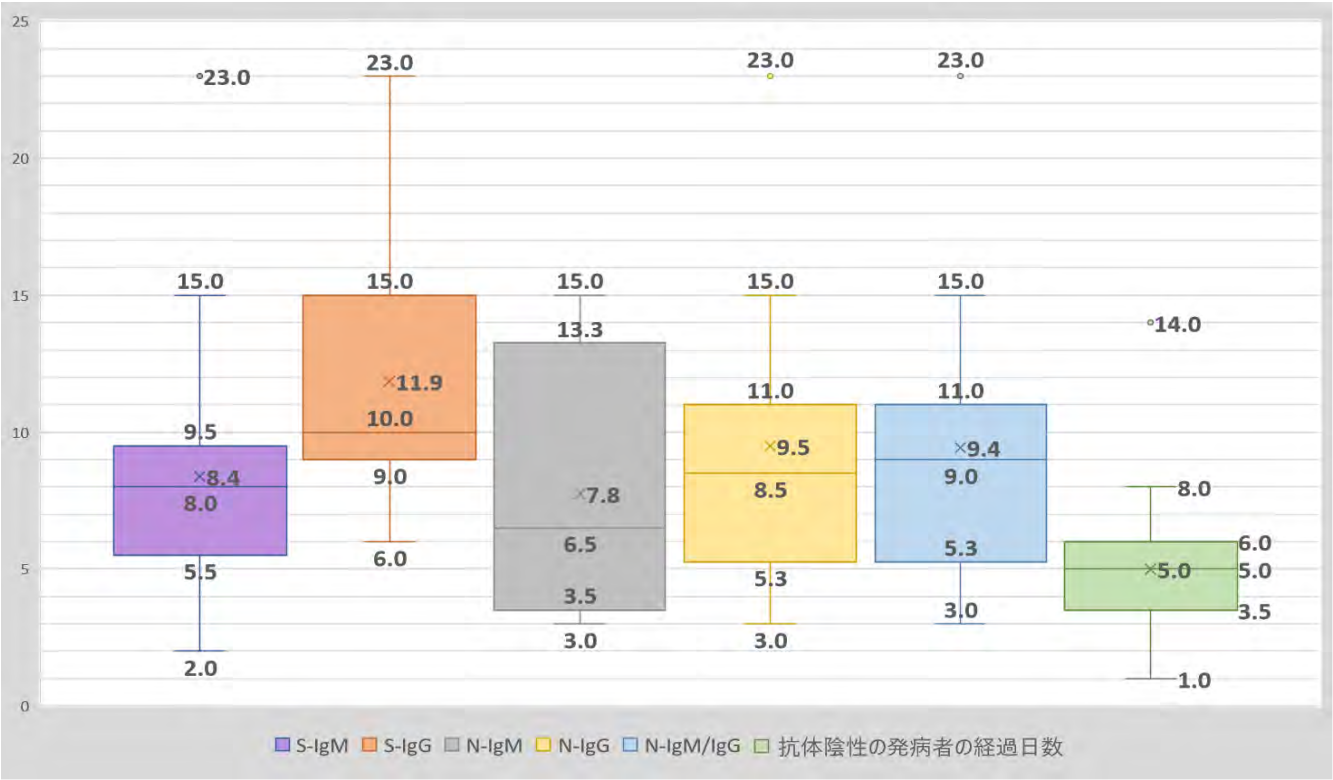


図 1：抗原陽性者の発症日から計算した各種抗体検査陽性日と全ての抗体陰性者の相関

IgG から上昇するようなケースがあることが推察でき、COVID-19 においては通常の感染症と異なる抗体値の上昇を示す可能性が示唆された。前述の通り、N-IgM については、N-IgG および N-IgM/Ig の陽性確認日数との間に比較的明瞭な違いが見られたが、シスメックス社製試薬での N 抗原に対する抗体は、COVID-19 の診断補助を目的とした場合、IgM と IgG を区別する必要は乏しいかもしれない。S 抗原に対する抗体については、S-IgM が 5.5~9.5 日と比較的短期間に陽性確認までの日数が集約されていたのに対し、S-IgG は 9.0~15.0 日と 1.6 倍遅いというかなり明瞭な時間差が認められた。これには、S-IgG が中和抗体であることが関係しているのかもしれない。

これら抗体の挙動結果は、COVID-19 入院患者で抗体が陰性であった症例の検査日と発症日との期間が 3.5~6.0 日と、抗体陽性となった群の期間に比べ、優位に集約された範囲に収まるという結果が得られたことから今後何らかの意味づけができる可能性が考えられる。

しかし、今回の検討は発症から採血し抗体値を測定したタイミングが連日でもなく、一定の期間後に統一したものでもないので、その経過日数は真の陽転化に要する期間を示すものではなく、あくまでレトロスペクティブな参考値であるという試験デザインの限界がある。

いずれにせよこれらの結果より、術前検査における抗体検査は採血を用いることで、鼻腔からの検体採取を必要とする抗原検査に比べ、術者の感染リスクは大幅に軽減できるものの、発症から陽性となるまでの期間が、比較的短いと推定される S-IgM でも発症後 1 週間前後かかる可能性が示唆された。COVID-19 患者は、発症の約 2 日前から他者に感染させうる抗原量を排出することを考えると、術前検査のスクリーニングには抗体陽陰性を抗原検査の代理指標として用いることはできないと言わざるを得ない。

しかし、今回の結果から抗体検査は、感染からの経過日数の把握に役立つ可能性が考えられた。現在、COVID-19 は感染症法上 2 類相当感染症に位置づけられており、発症日から最低 10 日間の隔離が必要となることや、今後 mRNA ワクチンが普及し、その接種によって S 抗原に対する抗体をすでに産生している COVID-19 患者が増えていくことも考慮すると、発症日の推定には、S-IgM の有用性が低くなる可能性がある。敢えて抗体検査だけで発症日を推測するには、S-IgG に加え N-IgG か N-IgM/IgG どちらかの測定をすることが有効になってくるかもしれない。一方で、S 抗原に対する抗体はワクチンの免疫付与効果の評価に用いることが望ましいと考える。

COVID-19 はまだまだ、研究上で未知の要素が多い。現場で働く医療従事者や基礎疾患をもつ入院患者の感染リスクを低減させ、ワクチンの普及による医療や社会生活を正常な形に戻す過程において、臨床検査に託される役割は大きく、今後も迅速で正確な診断方法の開発が望まれる。

謝辞

本研究は、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団「新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」により行われた。

報告にあたり、同財団に深甚なる謝意を表わすものである。

参考文献および発表論文

1) 厚生労働省：第 2 回抗体保有調査における中和試験の結果について

体幹部体表位置の動態計測による呼吸機能検査

研究責任者　大原綜合病院
画像診断センター
センター長　　森谷　浩史

１．はじめに

2019 年末から世界的に感染拡大した新型コロナウイルス感染下では、感染患者との濃厚接触を避ける観点から多くの臨床検査が実施困難となった。呼吸機能検査は被験者がマウスピースをくわえ、大きく吹き出す必要があるため、不顕性感染者からの感染拡大の契機に繋がりかねない。そこで、被験者との接触なく呼吸機能を計測する手段として、体表位置の計測から呼吸機能を計測する方法の臨床的妥当性の確認を目的とする。

２．内容

320 列 ADCT（Aquilion ONE）にて呼吸動態撮影を行った 30 例のデータを用いて、全位相の肺体積と胸郭体積を計測し、相関を求めた。

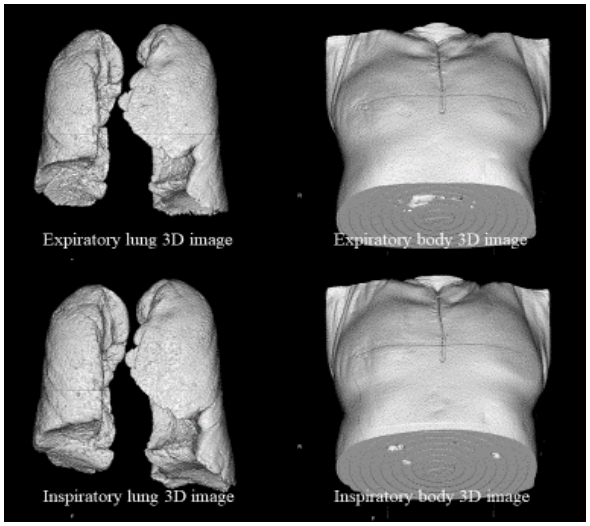


図１　呼吸動態 CT から作成した肺と胸郭（吸気位と呼気位）

320 列 ADCT により 160mm の範囲を肺の上半分と下半分を撮影、それぞれ 1 呼吸/6 秒撮影、0.35 秒間隔で再構成した。Workstation 呼吸動態解析機能（Ziostation2 : Phyziodynamics）を用いて呼吸位相ごとに上下肺を結合した [1),2)]。

適応基準:肺癌術前症例や軽微な COPD 症例。深吸気時に撮影範囲内に肺全体が含まれている。体表が撮影 FOV 内に含まれている。

除外基準：呼吸動態に大きな支障がある。

矢状断の呼吸動態形状から、胸式呼吸（胸郭の動きが大きい）9 例と腹式呼吸（胸郭の動きが少なく横隔膜の上下移動が大きい）21 例に分類した。

各症例の最大呼気位からの体積変動を算出し、全位相（13～15 位相）の肺体積と胸郭体積の相関を検討、近似曲線の回帰係数（傾き）と決定係数（R2）を求めた。

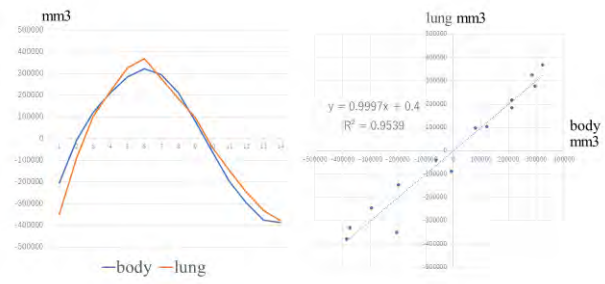


図２　肺体積と胸郭体積変動の１例（胸式呼吸）

３．成果と考察

全症例：回帰係数 1.55±0.74　R2 0.86±0.16
胸式呼吸：回帰係数 1.02±0.16　R2 0.96±0.01
腹式呼吸：回帰係数 1.77±0.78　R2 0.86±0.01

胸郭体積変動と肺体積変動はすべての症例で良好な相関を認めた。胸郭の動きが呼吸位相を反映していることを確認できた。胸式呼吸例では双方の体積がほぼ一致した。胸式呼吸例においては一回換気量を胸郭の体表面の位置計測で算出することが可能である。腹式呼吸例では肺体積変動値より胸郭変動値が少なかった。この原因は、腹式呼吸では今回用いたデータの撮影範囲外（腹部）での体積変動が大きいためと思われる。胸郭から腹部まで含めた体幹部体表面位置計測を行うことで腹式呼吸を含めた全ての呼吸様式で精度の高い計測が可能になると思われる。

４．まとめ

胸式呼吸例の体幹部の体表面位置計測から求めた体積変動は肺体積変動と一致した。計測範囲を胸郭から腹部まで拡大することで、呼吸様式の個体差に対応できることが推定された。この手法により、体表につけたマーカの動きや体表のビデオ動画撮影から呼吸曲線と呼吸機能を求める可能性を確認できた。また、呼吸機能検査の他に、安静時や睡眠時の呼吸モニタリングに応用できることが示唆された。

謝辞

本研究の実施に際し、研究助成を頂きました公益財団法人中谷医工計測技術振興財団に深く感謝致します。

以前から肺がんの術前癒着診断のために呼吸動態 CT を撮影しており、この技術を発展的に活用できないか考えておりました。今回、助成いただいたことで COVID-19 などの感染蔓延への対策に繋げるという目標で研究内容を再構築することができました。ありがとうございました。

参考文献

1）森谷浩史、他：呼吸動態 CT に表示される構造物には呼吸位相が反映されている　臨床放射線　63 巻 1 号　2018　1-13
2）村松　駿・森谷浩史・他：呼吸動態 CT のための独立音声指示装置の考案　日本放射線技術学雑誌　2018 年 72 巻 2 号

発表論文・報告

1）Nagatani Y. Moriya H. et al: Preoperative assessment of localized pleural adhesion: Utility of software-assisted analysis on dynamic-ventilation computed tomography European Journal of Radiology 133 (2020) 109347
2）Moriya H, et al: Respiratory function test without contact with the subject using radiological imaging techniques RSNA2020（北米放射線学会）2020 年 11 月 29 日～12 月 5 日 Chicago（web 開催にて発表）
3）森谷浩史：超高精細 CT と 4 次元動態 CT による肺癌の画像診断 第 40 回日本画像医学会学術集会ランチョンセミナー 2021 年 2 月 25 日～5 月 25 日（web 開催にて発表）
4）Moriya H, et al: Estimating respiratory volume by measuring thoracic volume - Analysis performed using respiratory dynamics CT data - RSNA2021（北米放射線学会）2021 年 11 月 28 日 - 2021 年 12 月 2 日 Chicago（発表予定）

気管支鏡検査時の飛沫感染防止シールドの開発

研究責任者　名古屋大学医学部附属病院
呼吸器内科
助教授　　長谷　哲成

１．はじめに

わが国では、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の感染拡大を防止するために、事態の急速な変化に即応した緊急措置等がなされている。緊急事態宣言により一旦新規患者数が減少したものの、緊急事態宣言解除後に再度新規感染者数が増加しており、今後 COVID-19 と共存した社会の形が模索されている。医療現場においても COVID-19 を念頭においた対応が必要とされている。

COVID-19 には無症状の感染患者が存在することが知られている。慶応大学病院では、入院前に施行した PCR 検査（COVID-19 以外の疾患の治療を目的とする入院予定で、COVID-19 の症状がない患者を対象）の結果として、0～7.5％の患者で SARS-CoV-2 が陽性であったことを報告している [1]。また、東京で行われた抗体を用いた検討では、およそ 0.7％で陽性者が同定されている [2]。これらのことは、一般社会での無症候性の COVID-19 感染患者の存在を示唆し、症状の有無に関わらず医療関係者は常に感染防止策を講じる必要があると考えられる。

呼吸器内科領域では、胸部疾患の診断目的に気管支鏡が行われている。本邦の癌死の第一位である肺癌は、大気汚染等を背景に現在も急増している。その病理診断や遺伝子診断のため、腫瘍組織検体が必要とされており、多くの患者で気管支鏡検査が行われている。気管支鏡検査では、気管支鏡が気管内に挿入されるため、患者は常に咳嗽をしている。外科手術等と異なり筋弛緩剤の投与を行うことが困難であり、患者の咳嗽を止めることはできない。また患者の苦痛緩和のため鎮静薬の投与を行っており、その鎮静作用により患者に咳嗽を我慢させるといったことも困難である。この様な背景から気管支鏡は、気管内挿管と同様にエアロゾルが発生する可能性のある危険な手技として特に注意が必要とされている [3]。これらエアロゾルが発生する可能性のある手技に対しては、通常の標準予防策に加え、接触・飛沫予防策（眼の防護具（ゴーグル、フェイスシールド等）、長袖ガウン、手袋等）や N95 マスクまたはそれと同等のマスクを装着する様推奨されている。

しかし、上記予防策では不十分な可能性が示唆されている。気管内挿管時の患者の飛沫を再現した実験では、術者の防護具、手袋、髪、首等だけでなく、2m 離れたモニターにも汚染が確認されており [4]、実際に本邦でも気管内挿管時の医療従事者の感染事例が報告されている。そのため、上述した予防策に加え、アクリル製の飛沫防止機器を患者にかぶせる方法が有用性であると報告されている [4]。一方、気管支鏡検査に関しては、これら飛沫飛散防止機器に関する報告は行われていない。上述のように気管支鏡検査時に患者は常に咳嗽をしており、気管内挿管よりも医療従事者に対する感染リスクは高いと考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では気管支鏡検査

時の飛沫感染防止シールドの開発を目的とする。患者からの飛沫感染防止を効率的に行いつつ、気管支鏡検査時に必要な手技への影響や操作性を損なわないものを作成する必要があると考えられる。

２．内容

当院呼吸器内視鏡学会指導医・専門医、救急専門医、医療安全専門医、感染制御部門、シュミレーションセンターの話し合いのもと、飛沫感染防止シールドのプロトタイプ案を考案した(図 1)。

このプロトタイプシールドの特徴は、生検に必要な鉗子孔や気管支鏡操作部位がシールド外であり、さらに両サイドに切れ込みを設けることにより術者の操作性が保たれていること、従来の気管内挿管用の飛沫防止箱[4]とは異なりシールド上部を可動性の棒とそれを覆うビニールにより気管切開も含む様々な状態・体型の患者に対応して気管支鏡検査が実施できること、である。

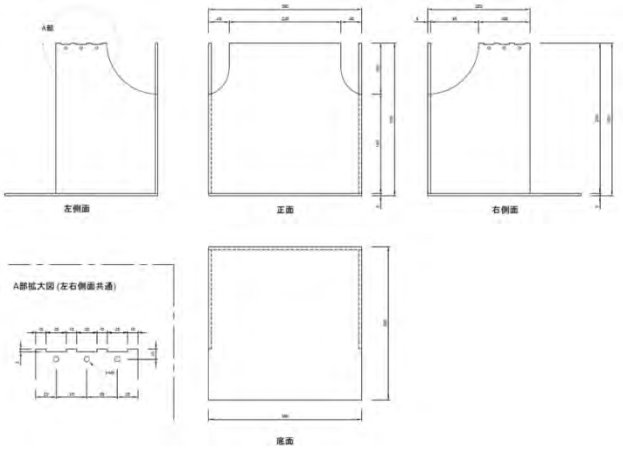


図 1 飛沫感染防止シールドプロトタイプ
（上：図面、下：写真）

３．成果

診療科内での合議の上、感染予防目的でこのプロトタイプを用いた気管支鏡検査を開始した。その結果を図 2 に示す。シールドを使用する以前の患者及び使用開始後の患者では、年齢でシールド使用群が若かったものの、性別、行う気管支鏡手技に大きな差を認めなかった。また、気管支鏡シールドを使用した群においても必要酸素投与量や、脈拍や血圧の変化に大きな差を認めなかった。さらに、シールドを用いているにも関わらず検査時間には大きな差を認めなかった。

一方、実際に手技を行う場合において、患者顔面を覆うビニールが一部移動してしまうことで、シールド効果が減少するため、適宜修正が必要になるなどの課題も明らかとなった。

患者及び医療者に安全な気管支鏡検査を施行できるように現在使用しているシールドを、今後更に改良する計画である。

		シールド		
		なし (N=36)	あり (N=36)	p値
年齢(中央値、範囲)		75 (45-87)	68.5 (39-87)	0.0069
性別 (男、%)		24 (66.7)	19 (52.8)	0.3366
手技	観察のみ (N、%)	6 (16.7)	2 (5.6)	
	直視下生検	1 (2.8)	3 (8.3)	
	TBB	17 (47.2)	17 (47.2)	
	TBNA	6 (16.7)	5 (13.9)	
	BAL	7 (19.4)	10 (27.8)	
	TBLB	5 (13.9)	5 (13.9)	
検査時間(中央値、分)		50	45	0.2481
酸素投与量 (中央値、範囲、L/分)		2 (2-10)	2 (2-6)	0.7019
脈拍数変化 (中央値、回)		26.5	31.5	0.3016
血圧変化 (中央値、mmHg)		62.5	50	0.082

図 2 患者背景と結果

４．まとめ

気管支鏡検査用の飛沫感染防止シールドプロトタイプを作成した。患者に対する安全性は確認できたものの、実際の使用においては課題があり、今後更に改良を加える予定である。

謝辞

本研究の一部は公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の新型コロナウイルス感染症対策助成プログラムの支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献および発表論文

1) 慶応大学ホームページ
http://www.hosp.keio.ac.jp/oshirase/important/detail/40185/

2) 東京大学ホームページ
https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/20200604.html

3) 国立感染症研究所　新型コロナウイルス感染症に対する感染管理(改訂 2020 年 6 月 2 日)
https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/2019nCoV-01-200602.pdf

4) Canelli R, Connor CW, Gonzalez M, et al: Barrier Enclosure during Endotracheal Intubation. New Engl J Med 382:1957-1958, 2020

所要時間 30 分以下の迅速な新型コロナウイルス PCR 検査法の確立

研究責任者　信州大学医学部附属病院
臨床検査部
主任臨床検査技師　　重藤　翔平

１．はじめに

新型コロナウイルスにおいては多数の院内感染事例が報告されている[1)]。感染は、当事病院の機能を停止させ、周辺地域の医療体制の質を著しく低下させる可能性がある。院内感染を防ぐためには、来院患者に対する水際対策を講じる必要がある、特に救急医療を担う中核病院では、飛沫や体液が拡散する可能性のある緊急手術などの処置を行う前に検査を行い、新型コロナウイルスに対する感染リスクを考慮して処置にあたる必要がある。発熱などの症状が無くてもウイルスを有し、感染を広げる可能性のある新型コロナウイルスにおいては、ウイルス本体を高感度に検出することができる PCR 検査による処置前スクリーニングが最も意義のある水際対策になると考えられる[2),3)]。しかしながら、一般的に行われる国立感染研の病原体検出マニュアルに基づく RT-PCR 法(感染研法)は、検査開始から終了まで 2.5 時間以上を要する[4)]。また、現在臨床で用いられている核酸増幅検査法の中で所要時間の短い LAMP 法でも 45 分程度は必要であり[3)]、緊急に対応が必要な場合は、その結果を待つことが難しい。本研究では所要時間が 30 分以下となる PCR 検査法の確立を試みた。

２．内容

RT-PCR 法の工程は、核酸抽出と RT-PCR の 2 つに分かれる。それぞれの工程における時間を短縮するため、簡易抽出によるダイレクト RT-PCR 法および液滴型高速 PCR 装置を組み合わせ、迅速な検査法の検討を行った。

ダイレクト RT-PCR 法：新型コロナウイルスの PCR 検査で用いられる鼻咽頭拭い液などの検体には、PCR 反応を阻害する様々な夾雑物が存在する。そのため、RNA を分離精製する核酸抽出が必要であるが、30 分から数時間を要する。新型コロナウイルスにおいては、PCR 反応阻害物質の影響を抑えることが可能な試薬を用いて、核酸抽出を簡易な熱変性に置き換えた試薬キットが複数上市されている。それらは、ダイレクト RT-PCR 法と呼ばれ、感染研法よりも所要時間が短い（概ね 1 時間程度）。

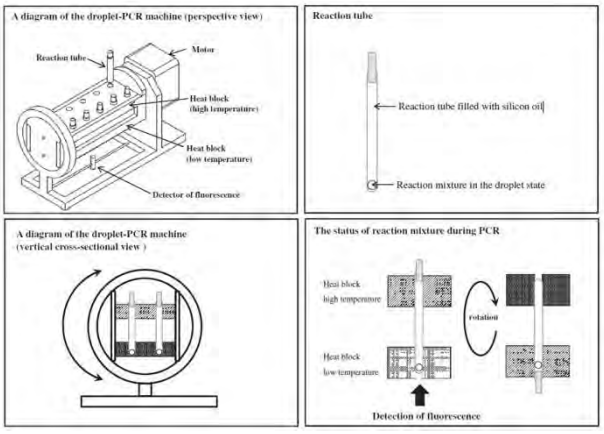


図１　液滴型高速 PCR の模式図（K. Matsuda et. al./ Clinica Chimica Acta 413 (2012), p.1743, Fig.1[5)]）

液滴型高速 PCR 装置：PCR の原理は、熱サイクルを繰り返し行うことで、酵素反応を進め核酸を増幅することである。従来式の PCR 装置は、1 つのヒートブロックを用いて熱サイクルを行うため、ヒートブロックの温度の上げ下げに時間がかかっていた。当院が所有するセイコーエプソン社（長野）製液滴型高速 PCR 装置を用いた高速 PCR は、シリコンオイル中で液滴化した反応液が、2 つのヒートブロック間を重力により移動することで PCR を行う方法である（図 1）[5]。コロナウイルスと同じ RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスにおいて、PCR 反応時間 15 分以下での検出を成功した実績がある [5]

3．成果

液滴型高速 PCR 装置は、1 ウェルの反応ボリュームが 1~2 μL と極僅かであり、反応時間も、1 サイクル 10 秒程度と、従来の装置と大きく異なる。そのため RT-PCR で用いる各試薬は、添付書の推奨条件では充分な増幅効率が認められなかった。そこで使用する試薬の選定、反応液組成や、PCR 反応パラメーターの調整を行なった。DNA Polymerase の濃度検討の結果を図 2 に示す。1 サイクル 10 秒（変性：3 秒、アニーリング/伸長反応：7 秒）の高速条件においても Polymerase の最終濃度を 0.25 U/μL 程度まで

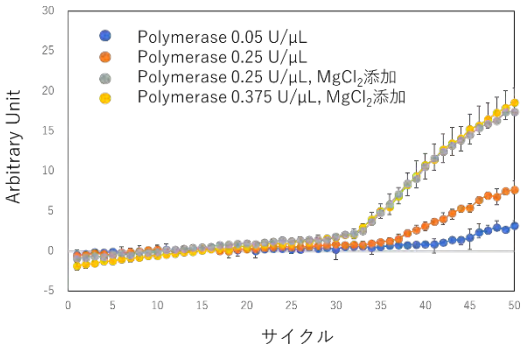


図 2　Polymerase の濃度検

高濃度とし、$MgCl_2$ などの濃度を調整することで増幅効率が改善した。最終的な本方法の概要を図 3 に示す。RT-PCR 反応時間は、およそ 10 分であり、少数検体であれば検体前処理の時間も含めて結果判定まで 30 分以下で操作可能であった。また、RNA コントロール試料（24, 48, 480 コピー/反応）を用いて多重測定を行い検出感度を確認したところ、最小検出感度は 48 コピー/反応であった。

4．まとめ

液滴型高速 PCR 装置とダイレクト RT-PCR 法を組み合わせることで、検出感度を犠牲にすることなく迅速な PCR 検査が可能であった。今後は、臨床検体を用いた性能検証を進める予定である。信頼性の高い PCR 検査を迅速なスクリーニング検査としても使用可能になることで、

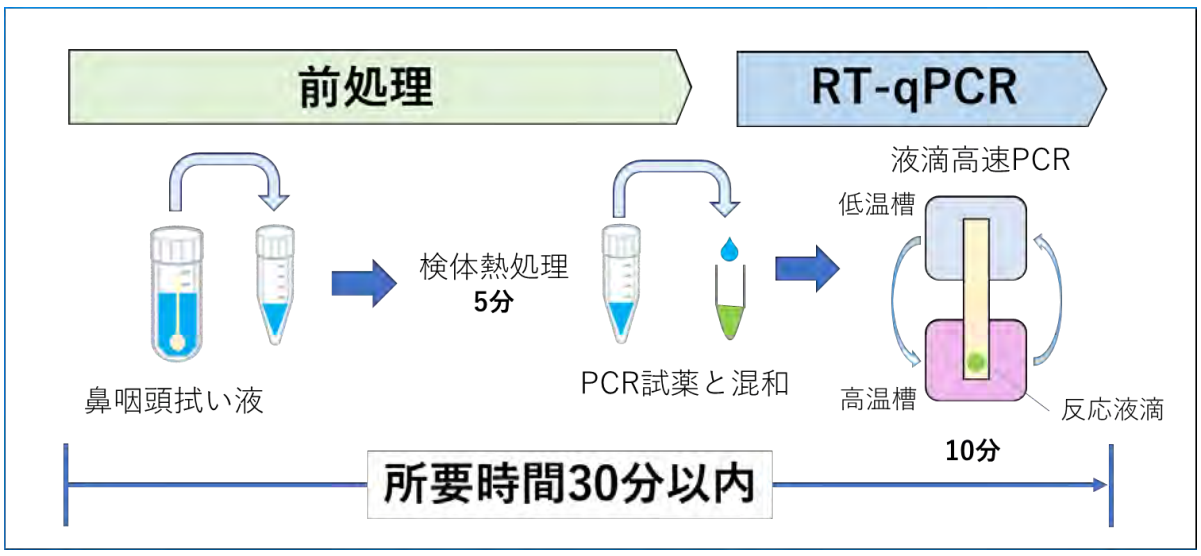


図 3 検査の概要

より効果的な水際対策が可能となることが期待される。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団研究助成の支援の下で行われたものであり、 ここに深く感謝申し上げます。

参考文献

1) Tani Y, Sawano T, Kawamoto A, Ozaki A, Tanimoto T. Nosocomial SARS-CoV-2 infections in Japan: A cross-sectional newspaper database survey. Int J Heal Policy Manag. 2020;9(10):461-463.
2) 国立国際医療研究センター国際感染症センター. 新型コロナウイルス感染症に対する感染管理. 国立感染症研究所; 2021. https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/covid19-01-210630.pdf.
3) Yamamoto K, Ohmagari N. Microbiological Testing for Coronavirus Disease 2019. JMA J. 2021;4(2):67-75.
4) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 令和 2 年 3 月 19 日. https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf. Published 2020.
5) Matsuda K, Yamaguchi A, Taira C, et al. A novel high-speed droplet-polymerase chain reaction can detect human influenza virus in less than 30min. Clin Chim Acta. 2012;413(21-23):1742-1745. doi:10.1016/j.cca.2012.06.026

深部静脈血液還流促進による血栓症防止装置の開発

研究責任者　国立循環器病研究センター
循環制御部
特任研究員　　鄭　　燦

１．はじめに

下肢静脈の血液が心臓に還流するには、筋肉ポンプの働きが欠かせないものである。長期間立位又は同じ姿勢座り（飛行機、椅子座り）又は寝たきり状態は筋肉ポンプ（図１）の働きが少ないために、下肢に血液が溜まるので、血栓の形成による肺血栓症と静脈圧の上昇による静脈瘤が発生することを臨床では周知の事実である。医療現場では手術中もしくは手術後に発症することがあることから、患者の下肢運動を補助して静脈の血流速度を増加し、血栓を予防している。抗凝固療法のほか、弾性ストッキングや空気圧迫装置などが利用されている。しかし、空気圧迫装置は一定な効果は認められているが、圧迫と解除の切り替えが遅く、筋ポンプの働きを完全に発揮できない、また、コンプレサーから発生する騒音が使用環境を制限する；弾性ストッキングは持続的に体表面を圧迫するので血管抵抗が増える、また、発汗などによる不快感が生じる。最も有効なのは人手によるマッサージだが常に気軽く受けるのは難しい。

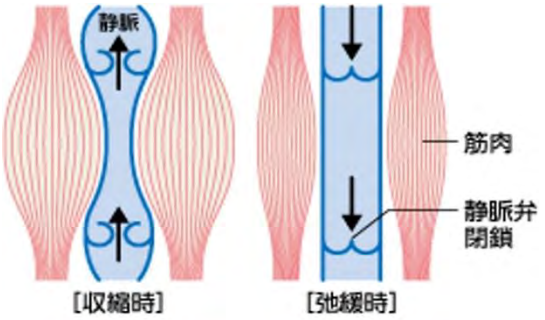


図１．筋肉ポンプの原理

一方、2019 年末中国で新型コロナウイルスが人への感染が発生してから全世界範囲で甚大な被害を及ぼし続けている。一年半余りの間、既に 2 億ぐらいの感染者を確認されて、その中に４百万人以上が死亡した。ウイルスの感染拡大を止める策とワクチン開発と接種が被害を止める決定的な手段として期待されている中、重症患者の適切な治療法の確立が死亡者数を減らす要因である。しかし、新型コロナウイルス感染症の病態生理等について不明な点が多く残っている。それを解明するために、ドイツのハンブルク連邦政府の命令により、COVID-19 が確認された後死亡した患者の剖検が行われた。その結果、生前には血栓症が疑られなかったけれど、58%(7/12)の死者に静脈血栓を発見し、その中４人は静脈血栓塞栓症が直接死因と結論をつけた。また症例数多くないが、静脈血栓症が重症患者の死因に繋がる事実を示した [1]。新型肺炎の重症患者は入院期間が長く、低酸素状態で昏睡状態と呼吸器補助等原因で身体動かないので、下肢の血液が溜まり易くなる、又はコロナウイルスの多臓器への侵襲による血管内皮損傷より血栓が発生し易くなることが考えられる。そこでまず、筋肉ポンプの原理を発揮できる装置があれば、深部静脈血栓症を防ぐことで重症患者の治療効果の改善に繋ぐことできるのではないかと思います。この様な現状から、より有効性と利

便性を改善された新しい深部静脈血流促進装置が病気予防と治療や、日常生活での疲労回復などに役に立つことを期待される。

２． 内容

本研究では、臨床と日常に使用できる、より有効性と利便性を改善された新しい深部静脈血流促進装置（以下は装着と簡略）の開発を目的として、既存の製品の問題点を克服するために、新しい発想で筋肉ポンプの原理を効率的に発揮できる装置を提案と試作機を創り出した。知財戦略として、特許出願の準備段階であるために、装置の詳細情報の記述を控えて擱きます。この装置の効果を試すために、超音波ドップラー装置で（TOSHIBA, TUS-A400, プローブ PLT-704SBT）深部静脈血流測定し、装置の始動による血流速度変化を検証した。

３． 結果および考察

静脈血流波形の特徴

健常な被検者が仰向けの臥位状態で大腿内側から下肢大静脈の血流速度測定を行った。下肢大動脈の血流速度は心拍動波形（図２）に対して，下肢大静脈は呼吸運動の影響を受けて、吸気に心臓方向への流れが速くなり、呼気時に血流速度が減る特徴である（図３）。呼吸の影響を減らすために、被検者が呼吸運動を呼気状態で数十秒間止めると静脈血流速度が低いレベルで相対的揺れが少なくなっている（図４）。

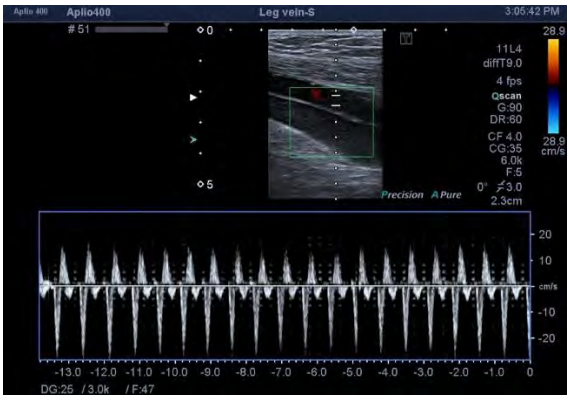


図２． 下肢大動脈の血流波形。

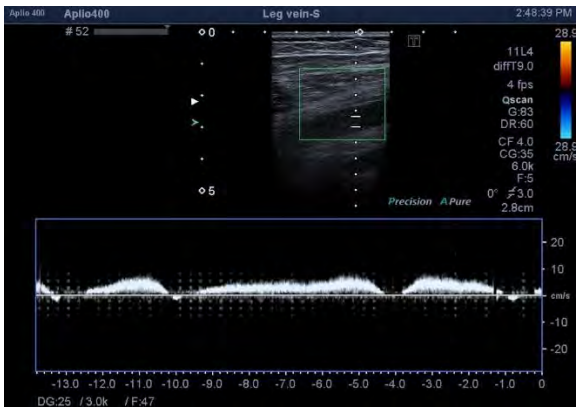


図３． 呼吸時の下肢大静脈の血流波形。

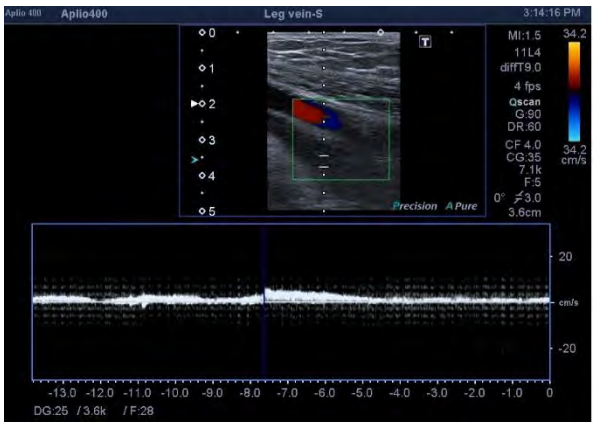


図４． 呼気状態で呼吸を止める時の下肢大静脈の血流波形。

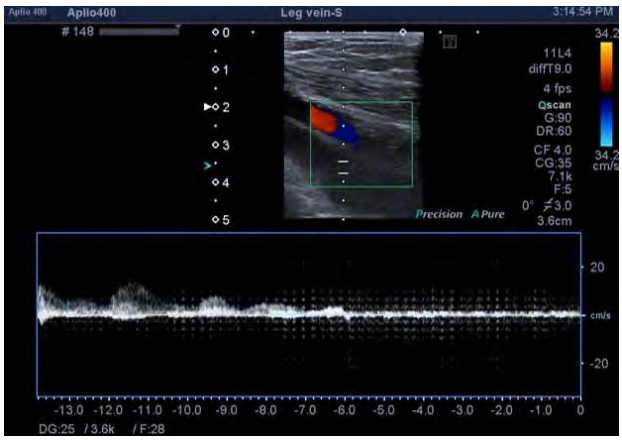


図５． 下肢大静脈の血流波形。呼気で呼吸を止める時に下肢圧迫装置を起動の効果。

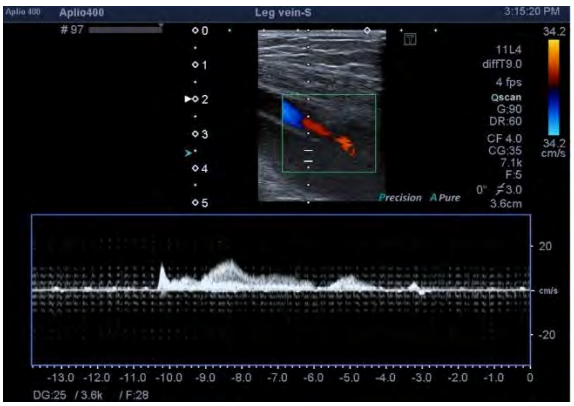


図６．下肢大静脈の血流波形。呼気で呼吸を止める時に下肢圧迫装置を起動の効果。

装着の静脈血流促進効果

装置は静脈血流速度計測前に下肢に装着して置く。呼気で呼吸を止める時に装置を始動すると、静脈血流が明徴に増えることが認めた（図５と図６）。一回の動作は圧迫と完全解放まで約７秒の間、前半の圧迫時に血流増加分が大きく、その後減る現象が観察された。

４．まとめ

深部静脈血液還流促進する方法として、筋肉ポンプ原理を発揮できる新しい機械式圧迫装置を提案した。本研究では、この実現のために動力源のギアモータとその制御回路及プログラミンによって、体表面から下肢深部静脈を圧迫装置の製作と評価を行った。この新しい構造で深部静脈血液還流促進効果を被検者で確認された。今後、完成品向けての更なる調整と工夫することで、これまでの既存製品と比べて、より効果的に、快適性と利便性などを改善することが期待する。

謝　辞

本研究は中谷医工計測技術振興財団の「緊急支援新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」の補助を受けてはじめ実施したものである。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献および発表論文

1）Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. Annals of Internal Medicine. 2020;173:268-277. doi:10.7326/M20-2003

SARS-CoV-2 および抗 SARS-CoV-2 抗体検出のための蛍光偏光イムノアッセイ

研究責任者　北海道大学　大学院工学研究院
応用化学部門
教　授　　渡慶次　学

1．はじめに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2019 年 12 月に最初の感染が報告されて以来、現在（2021 年 7 月）に至るまで世界中で感染が拡大している。すでに COVID-19 に有効なワクチンの接種が世界中で行われているが、検査で感染者を特定し、隔離等の対策を継続することが今後も不可欠である。COVID-19 の検査には、一般にウイルスの遺伝子を検出するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法が用いられている。しかし、検査できる場所に制約があり、検査の時間と手間がかかるという欠点がある。一方で、抗原あるいは抗体の簡便かつ迅速な簡易検査法としてイムノクロマト法があるが、イムノクロマト法は定性的な結果しか得られず、判定誤差が生じやすいという問題があった。

そこで本研究では、簡便かつ迅速に SARS-CoV-2 および抗 SARS-CoV-2 抗体を検出することを可能とする新しい蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA: Fluorescence Polarization Immunoassay）を開発することを目的とした。

2．蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA：Fluorescence Polarization Immunoassay）

FPIA は、低分子を測定するための競合イムノアッセイとして知られており [1]、血中薬物濃度測定や食品分析などに用いられている [2]。我々の研究グループでは、FPIA の迅速性（数秒～数分）と簡便性（抗体の固定化と洗浄操作が不要）という特徴は、オンサイト分析に適していると考え、測定装置の小型化・高性能化 [3),4)] とアプリケーション開発に取り組んできた [5]。最近我々は研究を進めていく中で、FPIA は低分子だけでなく、タンパク質やウイルスの検出も可能であることを見出した。従来の FPIA は、測定対象と測定対象を蛍光ラベル化したトレーサーを抗体に対して競合反応させる（図 1）。トレーサーは分子量の小さな低分子なので、抗体と結合すると溶液中の回転運動が抑制され、トレーサーが発する蛍光の偏光度（*P*）が変化する。一方、タンパク質やウイルスは分子量が大きいため、溶液中の回転運動がもともと小さい。そのためそれらのトレーサーは抗体と結合しても *P* はほとんど変化しない。そこでタンパク質やウイルスを測定するために、従来の競合法ではなく、非競合

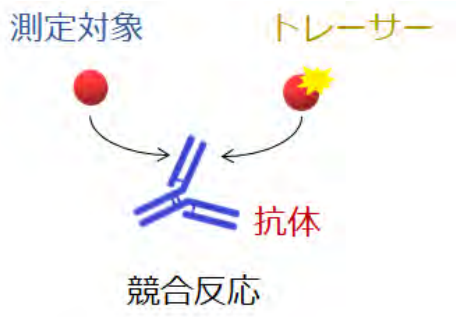


図 1　FPIA の原理（競合法）

法による新しいFPIAを着想した（図2）。タンパク質やウイルスを検出する場合は、抗体断片（Fab、scFv、VHHなど）を蛍光ラベル化したものをトレーサーとして用いる（図2A）。また、抗体を検出する場合は、抗原断片を蛍光ラベル化したものをトレーサーとして用いる（図2B）。このように考案した非競合法は、測定対象に応じたトレーサーを開発することで、タンパク質や

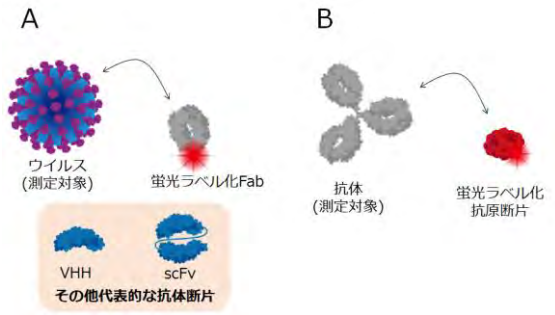


図2　非競合FPIAの原理　（A）測定対象がウイルスの場合　（B）測定対象が抗体の場合

ウイルス、抗体の検出が可能になる。これまでにFabトレーサーによるC反応性タンパク質[6]と鳥インフルエンザウイルス（AIV）[7]の検出、VHHトレーサーによるIgGの検出[8]、AIVスパイクタンパク質断片トレーサーによる抗AIV抗体の検出[9]に成功した。本研究では、この非競合FPIAを応用して、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）および抗SARS-CoV-2抗体を検出することに取り組んだ。

3．測定システム

図3Aに本研究で使用した蛍光偏光測定装置を示す。血清自体の自家蛍光の影響を低減するために、以前に開発した装置[3),4)]の光源および光学系を改良した。測定用のマイクロ流路チップは、9本の流路が集積されており、9サンプルの同時測定が可能である。測定に必要なサンプル量は、1流路当たり20 μLである（図3B）。

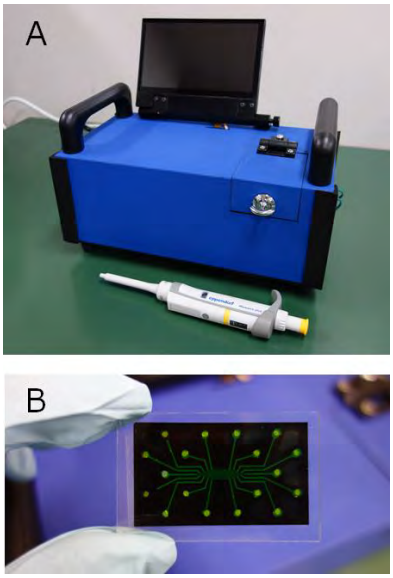


図3　A：装置　B：マイクロ流路チップ

4．SARS-CoV-2の検出

FPIAの原理から、分子量の小さなトレーサーを用いた方が測定感度が高くなる。そこで本研究では、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のACE2受容体に対する結合部位（RBD： Receptor Binding Domain）を認識するscFv（single chain Fv:分子量～25kDa）とVHH抗体（variable domain of heavy chain antibody：分子量～15kDa）を蛍光標識（HiLyte Fluor 647）したトレーサーを作製した（F-scFvとF-VHH）。市販のRBDをヒト血清にスパイクしたサンプルと作製したトレーサーを反応させ、FPIAを行った。サンプルとトレーサーを含む試薬等（サンプル：F-scFv or F-VHH：1%BSA/PBS溶液：PBS＝10：10：10：70）をマイクロチューブ中で20分（25℃）インキュベーションした後に、混合溶液20 μLをマイクロ流路チップに導入してFPIA測定を行った。図4にF-VHHをトレーサーとして用いた場合のRBDの検量線を示す。RBDの増加と共に偏光度変化（$\Delta mP = 1000 \times P_{サンプル} - P_{ブランク}$）が大きくなっていることがわかる。F-VHHをトレーサーとして用いた場合は、F-scFvに比較すると検量線のΔmPが大きくなり、分子量の小さなVHHの方が測定には適していることを確認した。現在、不活化した新型コロナウイルスを用いた評価を実施

中である。

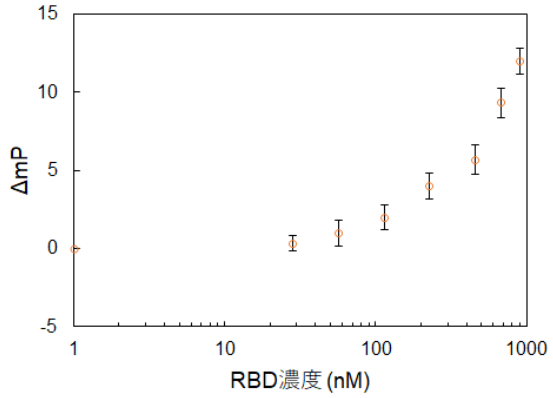


図 4　RBD の検量線

5．抗 SARS-CoV-2 抗体の検出

本研究では、抗 SARS-CoV-2 Spike RBD IgG 抗体を測定対象とした。トレーサーとして、RBD 断片を蛍光標識（HiLyte Fluor 647）したものを作製した（F-RBD)。市販の抗 SARS-CoV-2 Spike RBD polyclonal rabbit IgG 抗体をヒト血清にスパイクしたサンプルと作製したトレーサーを反応させ、FPIA の実験条件を最適化した。サンプルとトレーサーを含む試薬等（サンプル：F-RBD/PBS 溶液：1%BSA/PBS 溶液：PBS＝5：20：40：335）をマイクロチューブ中で 15 分（25℃）インキュベーションした後に、混合溶液 20 μL をマイクロ流路チップに導入して FPIA 測定を行った。図 5 に抗 SARS-CoV-2 Spike RBD IgG 抗体の検量線を示す。抗体量の増加と共に ΔmP が大きくなっており、この検量線を用いて血中（血清中）の抗 SARS-CoV-2 Spike RBD IgG 抗体の濃度を定量することが可能となる。

次に、SARS-CoV-2 の感染者の血清 20 検体（陽性サンプル）と非感染者の血清 10 検体（陰性サンプル）を用いて、開発したアッセイ法の性能評価を行った。図 6 に 30 検体の評価結果を示す。図 6 の結果に基づいて作成した ROC 曲線を図 7 に示す。AUC（ROC 曲線下面積）は、0.965 であった。一般に、AUC が 0.9 以上の検査法は精度の高いと考えられており [10]、本研究により精度の高い抗 SARS-CoV-2 抗体検査法を開発することに成功した。

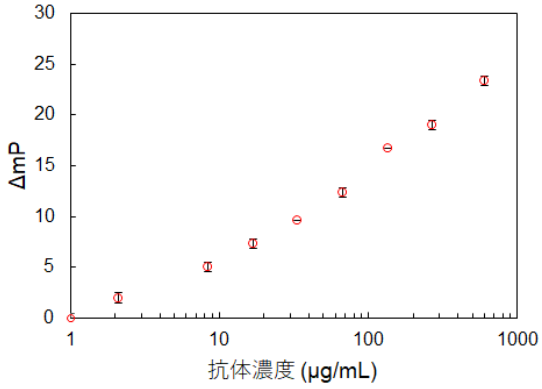


図 5　抗 SARS-CoV-2 抗体の検量線

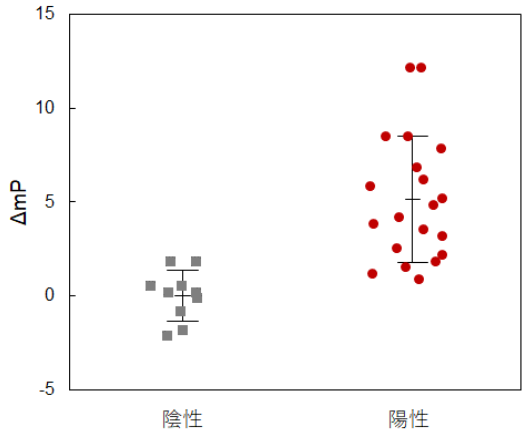


図 6　散布図（陰性サンプル：10；陽性サンプル 20）

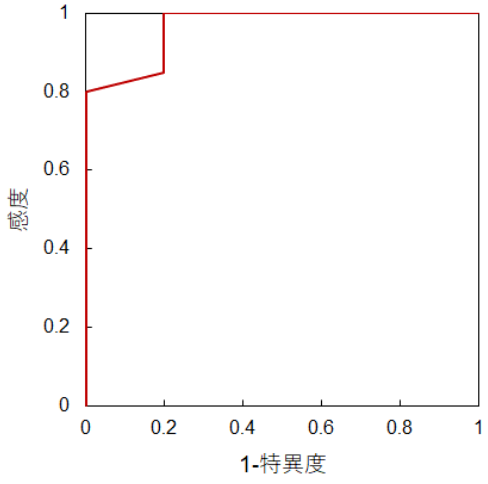


図 7　ROC 曲線

６．まとめ

本研究では、簡単な操作で迅速（～20 分）に SARS-CoV-2 および抗 SARS-CoV-2 抗体を検出することを可能とする非競合蛍光偏光イムノアッセイを開発した。SARS-CoV-2 に関しては、更なる評価（実検体評価など）が必要であるが、基本的なアッセイフォーマットは構築できたと考えている。また、抗 SARS-CoV-2 抗体に関しては、当初目的を達成することができた。また、本研究で開発した非競合蛍光偏光イムノアッセイは、測定対象に応じたトレーサーを開発することで、さまざまな測定対象に応用されることが期待できる。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の援助のもとで行われました。ここに深く感謝申し上げます。また、研究を実施するにあたりご協力いただきました東北大学多元物質科学研究所の火原彰秀教授、Tianma Japan 株式会社の重村幸治氏、大学院生の西山慶音君と髙橋和希君に感謝致します。

参考文献

1) 免疫測定法, 生物化学的測定研究会編, 講談社 (2014).
2) O. D. Hendrickson, N. A. Taranova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, S. A. Eremin, Fluorescence Polarization-Based Bioassays: New Horizons, *Sensors*, **20**, 7132 (2020).
3) O. Wakao, K. Satou, A. Nakamura, K. Sumiyoshi, M. Shirokawa, C. Mizokuchi, K. Shiota, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi, A Compact Fluorescence Polarization Analyzer with High-Transmittance Liquid Crystal Layer, *Rev. Sci. Instrum.*, **89**, 024103 (2018)
4) O. Wakao, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, A. Hibara, M. Tokeshi, Sensitive Fluorescence Polarization Immunoassay by Optimizing Synchronization Mismatch Condition, *Sens. Actuators B*, **285**, 418-422 (2019).
5) O. Wakao, K. Satou, A. Nakamura, P. A. Galkina, K. Sumiyoshi, F. Kurosawa, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, M. A. Proskurnin, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi, High-Throughput Fluorescence Polarization Immunoassay by Using a Portable Fluorescence Polarization Analyzer, *Lab Chip*, **19**, 2581-2588 (2019).
6) K. Nishiyama, M. Fukuyama, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, A. Hibara, M. Tokeshi, One-Step Non-Competitive Fluorescence Polarization Immunoassay Based on a Fab Fragment for C-Reactive Protein Quantification, *Sens. Actuators B*, **326**, 128982 (2021).
7) K. Nishiyama, Y. Takeda, K. Takahashi, M. Fukuyama, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, H. Ogawa, M. Tokeshi, Non-Competitive Fluorescence Polarization Immunoassay for Detection of H5 Avian Influenza Virus Using a Portable Analyzer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 4619-4623 (2021).
8) M. Fukuyama, A. Nakamura, K. Nishiyama, A. Imai, M. Tokeshi, K. Shigemura, A. Hibara, Noncompetitive Fluorescence Immunoassay for Protein Determination, *Anal. Chem.*, **92**, 14393-14397 (2020).
9) K. Nishiyama, Y. Takeda, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, Y. Yonezawa, K. Imai, H. Ogawa, M. Tokeshi, Rapid Detection of Anti-H5 Avian Influenza Virus Antibody by Fluorescence Polarization Immunoassay Using a Portable Fluorescence

Polarization Analyzer, *Sens. Actuators B*, **316**, 128160 (2020).
10) D. L. Streiner, J. Cairney, What's under the ROC? An Introduction to Receiver Operating Characteristics Curves, *Can. J. Psychiatr.*, **52**, 121-128 (2007)

発表論文および学会発表

1) K. Nishiyama, Y. Takeda, K. Takahashi, M. Fukuyama, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Shigemura, A. Hibara, H. Ogawa, M. Tokeshi, Non-Competitive Fluorescence Polarization Immunoassay for Detection of H5 Avian Influenza Virus Using a Portable Analyzer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 4619-4623 (2021).
2) K. Nishiyama, K. Takahashi, M. Fukuyama, M. Kasuya, A. Imai, T. Usukura, N. Maishi, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, K. Hida, K. Shigemura, A. Hibara, M. Tokeshi, Facile and Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antibody Based on a Noncompetitive Fluorescence Polarization Immunoassay in Human Serum Samples, *Biosens. Bioelectron.*, **190**, 113414 (2021).
3) 高橋和希, 西山慶音, 福山真央, 粕谷素洋, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 火原彰秀, 渡慶次学, 蛍光偏光免疫分析法によるヒト血清中の抗 SARS-CoV-2 抗体の検出, 第 40 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2020), P-09, 2020 年 11 月 27 日（オンライン）
4) 高橋和希, 西山慶音, 福山真央, 粕谷素洋, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 重村幸治, 火原彰秀, 渡慶次学, ポータブル蛍光偏光測定装置を用いたヒト血清中の抗 SARS-CoV-2 抗体の検出, 第 81 回分析化学討論会, D2013, 2021 年 5 月 23 日（オンライン）

附属病院を含む医科大学内の下水試料からの新型コロナウイルス簡易検出法の検討と大学内疫学調査への応用について

研究責任者　浜松医科大学医学部
総合人間科学講座　化学教室
教務補佐員　　森島　賀子

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症の検査方法として、現在では、PCR 法、抗原検査、抗体検査などの検査法があり、それぞれの長所を活かす検査が行われている。また、このような個人を対象とした検査だけでなく、国内でも塩野義製薬などが下水中の新型コロナウイルスを定量 PCR 法によりモニタリングをするサービスを 2021 年 6 月 14 日から開始している [1)]。下水や環境水を用いた疫学調査は、多人数を対象とした調査が容易であるという利点があり、ワクチンが定期接種されているポリオウイルスでも環境水調査が行われている [2)]。しかし、PCR 法は手間と時間のかかる検査法であるため、本研究ではより簡単に検査が行える抗体検査を利用して、下水中の新型コロナウイルスを疫学的に調査する方法の開発を目的として研究を行った。

２．試料採取について

浜松医科大学倫理委員会で研究の承認を受け（研究番号：20-218)、浜松医科大学および付属病院内の全下水の最下流にて採水を行い、冷凍保存を行った。採水時には、水環境学会 COVID-19 タスクフォース発行の「下水中の新型コロナウイルス遺伝子検出マニュアル」に従い、防護具を装着した。アルファ株の流行などで採水協力者などから空気感染を不安視する声が出た時期には一時採水を中止したが、11 月から 4 月末まで週 1～2 回の頻度で、約 200mL 程度の採水を延べ 30 回行った。

5 月末以降も 2 回採水を行ったが、今後も新型コロナウイルスワクチン接種の進捗状況に応じて、採水の継続を計画している。

３．成果

これまでの実験で、蒸留水に添加した抗体が約 100 倍に濃縮されたことを確認しているが、実際の抗体検出には一万倍以上の濃縮が必要とされるため、長い濃縮時間でも抗体を安定化させる技法が必要となる。また下水試料については、WHO 発行の「Water, sanitation, hygiene, and waste management for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19」によれば、エアロゾル化した場合の感染対策が必要であるため、最終的な消毒のステップが検討されるとあるため、抗体を損なわないような消毒法を検討中である。

４．まとめ

現在は、下水試料中に存在するレベルの抗体濃度を検出できていないが、簡易検出法の開発が本研究の目的であり、できるだけ手間のかからない抗体の濃縮法の開発が今後の課題となると考えている。

謝辞

試料の採取時には、オリックス・ファシリティーズ株式会社の社員の皆様および浜松医科大学医療廃棄物処理センターの技術職員の御協力を受けました。ここに感謝の意を表します。

参考文献および発表論文

1) 塩野義製薬ホームページ
https://www.shionogi.com/content/dam/shionogi/jp/news/pdf/2021/06/210614.pdf
(2021年7月19日アクセス)

2) 吉田弘ら IASR Vol. 40, No.5 (No. 471) p88-90: 2019年

3) WHOホームページ
https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-IPC-WASH-2020.4
(2021年7月20日アクセス)

ナノスーツ法を用いた高感度イムノクロマトグラフィキットの開発
――新型コロナウイルスでの検証実験

研究責任者　浜松医科大学　光尖端医学教育研究センター
ナノスーツ開発研究部　部長・准教授　　河崎　秀陽

１．はじめに

人類は常にパンデミックの脅威にさらされている。感染症の蔓延を防ぐため、早期診断検査は常に求められている。RT-PCR では検査結果まで時間がかかり、救急現場での利用に難がある。イムノクロマトグラフィ(ICG)は操作が簡便で、現場の医療従事者が検査可能な非常に便利な検査ツールである。COVID-19 に関しても「ゲームチェンジャー」として ICG が期待されているが、常に感度が不十分と指摘されている。

２．内容

一昨年来、COVID-19 の大流行により世界で約 1.2 億人が感染し、甚大な健康被害と経済的な損失を被っている。現在、COVID-19 に対するワクチンが開発されているが、変異株が出現するなど収束までにはしばらく時間がかかることが予想される。現行の PCR 法は、検査時間が早いものでも報告まで数時間かかり〝その場〞観察は難しい。また、遺伝子増幅による高感度化が逆に偽陽性患者を生み出している。

国内外では ICG の感度を上げるためには、粒子開発とその読み出し機器に注力されてきた。電子顕微鏡を使用して金粒子そのものを直接観察して診断利用するという報告はなく本研究の独創的なところである。その独創性に加えて、多種類の病原体に対する高感度 ICG キットとして開発できるため、その応用できる範囲は非常に広い。安価で使いやすい電子顕微鏡の共同開発も目指しており、世界的な展開を目的とする。

我々はより迅速で偽陽性患者を少なくする可能性のある検査法として NanoSuit_イムノクロマト法を確立した。

３．成果

近年、我々は、「生物機能の高度活用技術」の一つとして、生物試料を「生きたまま・濡れたまま」高真空を必要とする電子顕微鏡で観察できる NanoSuit®法を確立した (PNAS, Takaku et al. 2013)。この技術により簡便・迅速に多くの試料をそのまま電子顕微鏡で観察することができるようになった。

この技術を ICG に応用し、標的金属粒子の直接観察による高感度化診断を探索した。インフルエンザ ICG 臨床検体を用いて、テストライン(TL)上にある金粒子数を電子顕微鏡でカウント後、background 粒子数との差を統計処理し陽性判定をおこなった(図 1)。その後肉眼診断と電子顕微鏡診断結果を RT-PCR 結果と比較した。

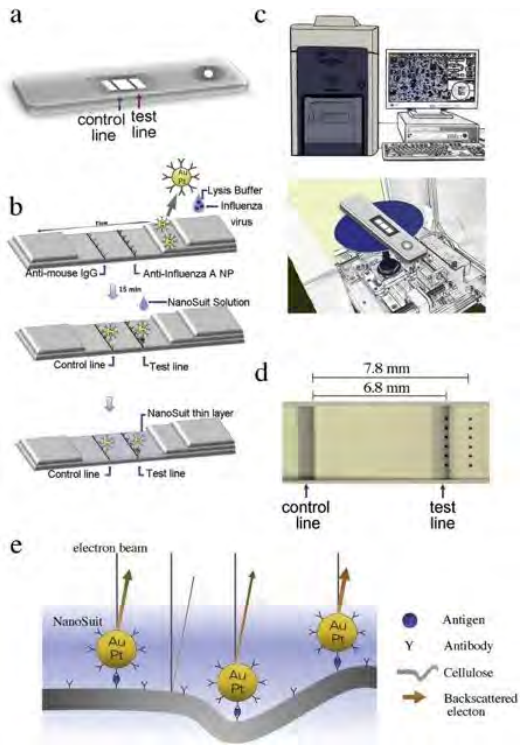


図 1. NanoSuit 法を使用したイムノクロマトグラフィ（LFA）の観察。 （a）テストラインとコントロールラインを示す診断キット。 （b）金/白金（Au / Pt）-Ab 結合 LFA キットの概略図。免疫複合体は、テストライン（TL）で抗インフルエンザ A 核タンパク質（NP）と反応し、コントロールライン（上、中央）で抗マウス IgG と反応します。 NanoSuit 処理後に NanoSuit 層が形成されました（下）。 （c）デスクトップ走査型電子顕微鏡（SEM;ミニスコープ TM4000plus;上）。 SEM チャンバー内のキットの配置（下）。（d）観測位置の決定。TL およびバックグラウンド（BG）領域で 6 つのフィールドが選択されました。（e）NanoSuit 層で保護された Au / Pt 粒子およびセルロースからの電子の後方散乱の概略画像。

NanoSuit 処理を行わないと、電子ビームエネルギーが高いため、セルロースの膨潤と残留液体が観察されました（図 2a）。対照的に、NanoSuit 処理後、セルロース膜はほとんど膨潤を示しませんでした（図 2b）。 TL の Au / Pt 粒子（矢印）が可視化され（図 2c）、セルロース膜のバックグラウンド領域ではほとんど観察できませんでした（図 2d）。

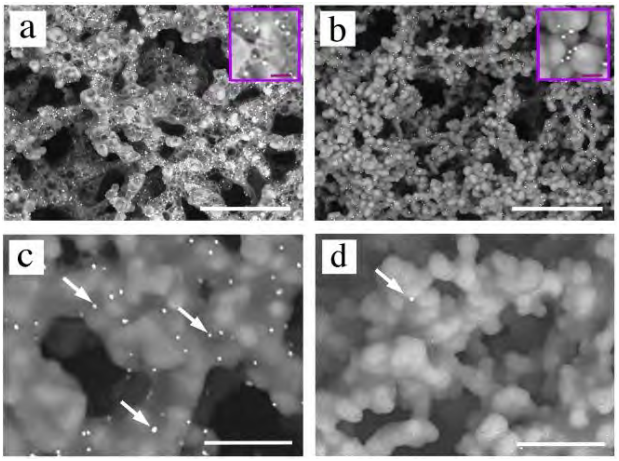


図 2. 電子顕微鏡（EM）によるセルロース上の Au / Pt 粒子の可視化。 （a、b）（a）および（b）NanoSuit 処理なしの固定化抗体を含むセルロースおよび Au / Pt 標識免疫複合体の代表的な画像。挿入図は拡大画像です。スケールバー、600nm。 （c、d）テストラインと背景の走査型電子顕微鏡画像の比較。 （c）「視覚的検出陽性」テストライン。 （d）セルロース膜の背景領域。白い矢印は代表的な Au / Pt 粒子を示しています。スケールバー：15μm（a、b）、3μm（c、d）。

インフルエンザ ICG 臨床検体を用いて、テストライン上にある金粒子数を電子顕微鏡でカウント後、background 粒子数との差を統計処理し陽性判定をおこなった。その後肉眼診断と電子顕微鏡診断結果を RT-PCR 結果と比較した。その結果、定量性があり（図 3）かつ感度向上を認めた（全体では肉眼診断は 77%、電子顕微鏡診断では 94%の陽性感度）。観察制度としても問題ないことを確認

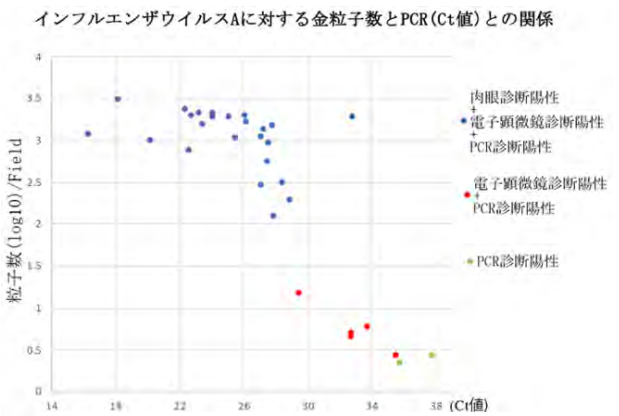


図 3. インフルエンザウイルス A における肉眼診断、電子顕微鏡診断と RT-PCR 診断の散布図

した（図 4）。

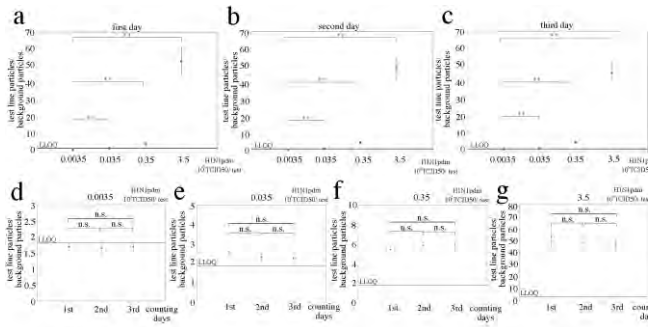


図 4. インフルエンザ A 陽性の電子顕微鏡（EM）観察の精度と精度の評価。（a-c）インフルエンザ A 抗原のさまざまな濃度（0.0035、0.035、0.35、および 3.5 H1N1pdm 10^5 TCID50 /テスト）での EM の精度と精度の比較は、（a）最初、（b）2 番目、および（ c）3 日目。データは 5 つの複製を表しています。（d-g）異なる用量の日中比較：（d）0.0035、（e）0.035、（f）0.35、（g）3.5 H1N1pdm 10^5TCID50 /テスト。 ** t 検定による P <0.01。 n.s. ：有意性なし。

特に低コピー数（Ct 値 30.0～38.0）の範囲では差は顕著となり（表 1）、肉眼診断より最高 100 倍以上の感度を示した。これは PCR 診断にほぼ等しい値であり、ICG の世界最高感度である。いち早く世界の研究者等に周知のため、特許出願後に Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 論文を発表した。

表 1. インフルエンザウイルス A における肉眼診断、電子顕微鏡診断、RT-PCR 診断の比較

Influenza A rRT-PCR	Ct	Macroscopic diagnosis (肉眼診断)		Electron microscopic diagnosis (電子顕微鏡診断)	
		Sensitivity (感度)	Specificity (特異度)	Sensitivity (感度)	Specificity (特異度)
Positive (n=31)	14.0≤Ct<22.0	100% (3/3)		100% (3/3)	
	22.0≤Ct<30.0	95.2% (20/21)		100% (21/21)	
	30.0≤Ct≤38.0	14.3% (1/7)		71.4% (5/7)	
	14.0≤Ct≤38.0	77.4% (24/31)		93.5% (29/31)	
Negative (n=166)	Ct>38.0		100% (166/166)		100% (166/166)

新型コロナウイルス検証実験

今までの結果を踏まえ新型コロナウイルスの ICG を使用して検証実験を行った。実施主体として国立大学法人　浜松医科大学　ナノスーツ開発研究部、協力団体として浜松市、協賛団体として（株）日立社会情報サービス、（株）タウンズ、NanoSuit（株）が参加した。この実証実験をマスコミに伝えたところ、

・PRTIMES（12/1）
・浜松市のプレスリリース（2020 年 12 月 1 日 16 時 00 分）
・SBS（12/1）
“抗原検査”精度を高める実験スタート（静岡県）（静岡放送（SBS））－ Yahoo!ニュース
・ＴＢＳ系列のＣＳニュースチャンネル
・静岡新聞（12/2）
・中日新聞（12/4）
・日立社会情報サービスホームページ（社外用）
・浜松医科大学ホームページ

と多数のマスコミに取り上げられ、大きな反響を呼んだ。

現在も検証作業は進んでいるが、その一部の data をここに紹介する（図 5）。

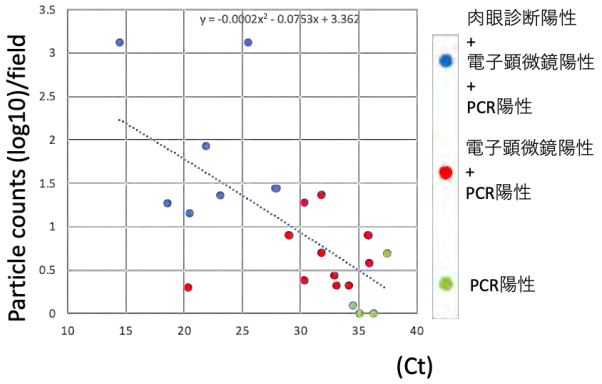


図 5. covid-19 における肉眼診断、電子顕微鏡診断と RT-PCR 診断の散布図

COVID-19 に関しても、インフルエンザと同様の検証をおこなっているが、こちらでも同様に PCR に匹敵する高感度化（Ct 値で最高 38 程度）を確認している。

現在我々は、患者からの一回の検体採取で、多種類の病原体候補から原因病原体を特定できる新たな迅速検査法の確立を目指しているが、秘密保持の関係で詳細はここでは割愛させていただいた。将来的には、高感度化・安全性・人工知能（AI）による自動カウンティングを備えた完全自

動化した「診断用に低価格化した専用電子顕微鏡」と「電顕専用イムノクロマトキット」を開発し、全国にサービスを展開するなど、社会インフラへの実装を目指しているところである。

４．まとめ

我々はこれまでに電子顕微鏡と溶液特性としてのナノスーツ法を組み合わせることにより、従来のイムノクロマトグラフィの肉眼診断と比較して 100～500 倍の陽性検出感度の改善が得られる技術であることがわかった。現在更なる高感度化も可能となってきている。本法は、COVID-19 を含めた多様な病原体をはじめ、多様な生体高分子に対しての検査法として応用可能な技術となる。たとえば、高感度であることで、唾液や尿などの非侵襲的サンプリングの検体を用いることができたり、血清から多様な体内情報を抽出したり、家畜などの感染症対策などに応用したりすることが可能である。社会インフラへの実装、SDGs への貢献、国民健康福祉の向上を図ることを目指していく。

謝辞

インフルエンザ A 型の rRT-PCR データを提供してくれた TAUNS Laboratories、Inc.と、SEM に関する有益なアドバイスをしてくれた日立製作所研究開発グループナノプロセス研究部に感謝します。また、浜松医科大学病院の臨床検査室では、定期検査後にインフルエンザ・新型コロナウイルス LFA ストリップを提供してくれたことに感謝します。

参考文献および発表論文

1) awasaki H*, Suzuki H, Maekawa M, Hariyama T*. Combination of the NanoSuit method and gold/platinum particle-based lateral flow assay for quantitative and highly sensitive diagnosis using a desktop scanning electron microscope. J Pharm Biomed Anal.20;196:113924. 2021

2) 崎秀陽*、針山孝彦、 特願 2020-79912、 イムノクロマト法による検出対象物質の検出方法及び検出キット、 出願日 2020.04.30

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 に対する免疫応答と COVID-19 の病態における意義

研究責任者　熊本大学大学院生命科学研究部
血液・膠原病・感染症内科学講座
准教授　　安永　純一朗

１．はじめに

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の世界的流行は未だ終息の兆しを見せず、その病原性発現機序にも不明な点が多い。本ウイルスにより発症する COVID-19 の病態は患者間の差が大きく、無症状～軽症の症例から、急速な呼吸不全、多臓器不全を来たす症例まで様々である。重症化にはサイトカインストームと呼ばれる過剰な免疫反応が関与しているとも考えられており、病態の理解、重症化予測、治療法の開発には、患者の生体内で起こっている免疫応答を正確に把握する必要がある。

２．内容

本研究では SARS-CoV-2 感染者（無症候性感染者および COVID-19 発症患者）における、ウイルス抗原に対する液性免疫応答を比較検討し、病態との関連を明らかにすると同時に、感染早期に重症化を予測しうるバイオマーカーを同定することを目的とし、以下の解析を行った。

1)SARS-CoV-2 抗原に対する抗体検出系確立
2)異なる病態の COVID-19 症例における抗体価変動の解析

３．方法

液性免疫応答の解析手法として、様々な抗原に対する血清中抗体価を測定可能な luciferase immunoprecipitation system (LIPS)法（図 1）を導入し、SARS-CoV-2 の Spike タンパク質（Spike1 および Spike2）と nucleocapsid タンパク質(NC)に対する抗体価を測定しうる実験系を確立することとした。

1)　　LIPS 法の構築

＜Spike1、Spike2、Nucleocapsid (NC)-NanoLuc 発現ベクターの構築＞

LIPS 法は抗原タンパク質とレポータータンパク質の融合タンパク質を血清中抗体により免疫沈降を行い、その産物と基質の反応による発光を測定することで抗体価を計測する方法である（図 1)。オリジナルの LIPS 法ではレポーターとして Renilla luciferase が使用されているが[1,2]、本研究ではバックグラウンドが低く感度が高い NanoLuc を使用した。抗原として SARS-CoV-2 Spike1、Spike2、NC の coding sequence を NanoLuc 遺伝子（プロメガ）の下流に配置し、NanoLuc タンパク質の C 末に各抗原タンパク質を融合したタンパク質を発現するプラスミド（以下の 3 種類）を構築した。

・pcDNA3-NanoLuc-Spike1
・pcDNA3-NanoLuc-Spike2
・pcDNA3-NanoLuc-NC

＜融合タンパク質の調整＞

上記 3 種類の発現ベクターをヒト胎児腎細胞由来細胞株である HEK293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後に細胞を回収。プロメガ社の Passive lysis buffer を用いて細胞溶解液を調整し、これを LIPS

用抗原液とした。Nano-Glo® Luciferase Assay System（プロメガ）を用いて、10^7RLU となる抗原量を決定した。

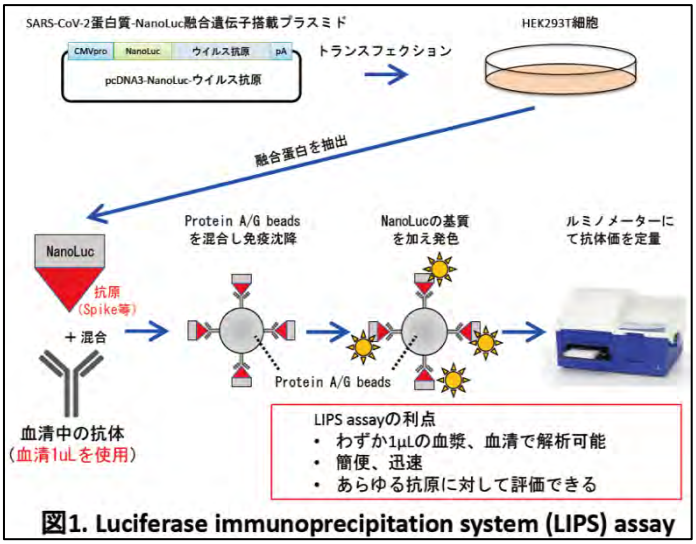


図1. Luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assay

＜LIPS assay＞

（試薬リスト）

・LIPS Buffer（20 mM Tris（pH 7.5）、150 mM NaCl、5 mM MgCl2、1% Triton X-100）

・Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads（磁石プレートを使い、LIPS 用 Buffer で３回洗浄し、置換し使用。）

・Nano-Glo® Luciferase Assay System

（反応条件）

(1).1 次反応として、LIPS 用抗原（10^7RLU）＋ヒト血清（1uL/well）＋LIPS buffer を混合、計 100uL とし、室温、30 分プレート用ミキサーにて攪拌する。

(2).2 次反応として、Protein A/G 磁気ビーズを 10uL 添加し、室温、30 分、シールをしてプレート用ミキサーにて攪拌する。

(3).150-200uL の LIPS Buffer で 5 回洗浄。

(4).基質（Nano-Glo® Luciferase Assay System：添付資料の通りに調整したもの）を 100ul/well で添加し、攪拌し、測定した。

４．結果

LIPS 法を用いて、COVID-19 罹患患者および健常人由来の血清中に存在する SARS-CoV-2 由来 Spike タンパク質（Spike1 及び Spike2）、NC タンパク質に結合する抗体を測定し、感染者で抗体価の上昇が検出できることを確認した（図 2）。

次に、COVID-19 罹患患者の経時的検体における各抗体価の測定を行った。

COVID-19 患者は

・軽症（無症状）

・中等症（肺炎）

・重症（人工呼吸管理）

に分けられ、さらにステロイド治療群と非治療群に分けられた。各患者から、治療およびその後の経過観察期間に 2-3 ポイントずつ採血が施行され、各検体における Spike1、Spike2、NC に対する抗体価を測定した。

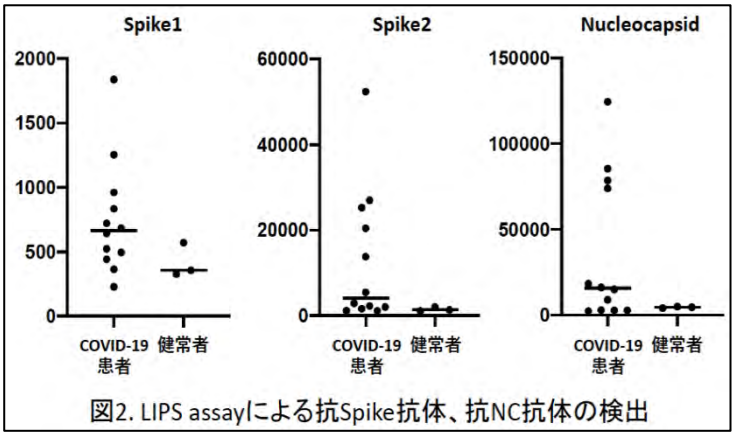


図2. LIPS assayによる抗Spike抗体、抗NC抗体の検出

重症度およびステロイド治療の有無と、抗体価の経時的変化の比較解析から、以下の結果が得られた（図 3）。

１．軽症では Spike1 ， Spike2, NC いずれの抗体価も低く、中等症と重症では高い傾向にある。特に Spike2 と NC ではその傾向が強い。

２．Spike1 に対する抗体価がステロイド治療により上昇が抑えられている可能性がある。

３．治療群、非治療群にかかわらず、中等症以上では長期間抗体が維持されている。

４．今回解析したステロイド治療群（および 1 例に関しては抗 IL-6 受容体抗体投与）においては、治療と各抗体価の変動との間に一定の傾向は認められなかった（図 4：中等症、図 5：重症）。

これらの所見より、これらの抗体価は重症化マーカーとなり得ること、また抗 Spike1 抗体は病勢および予後と関連する可能性が示唆された。

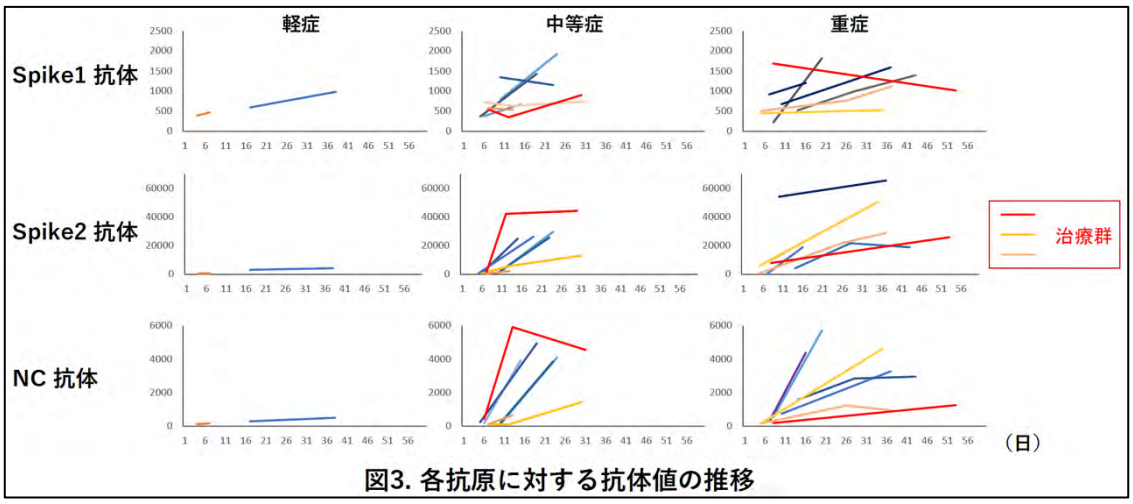


図3. 各抗原に対する抗体値の推移

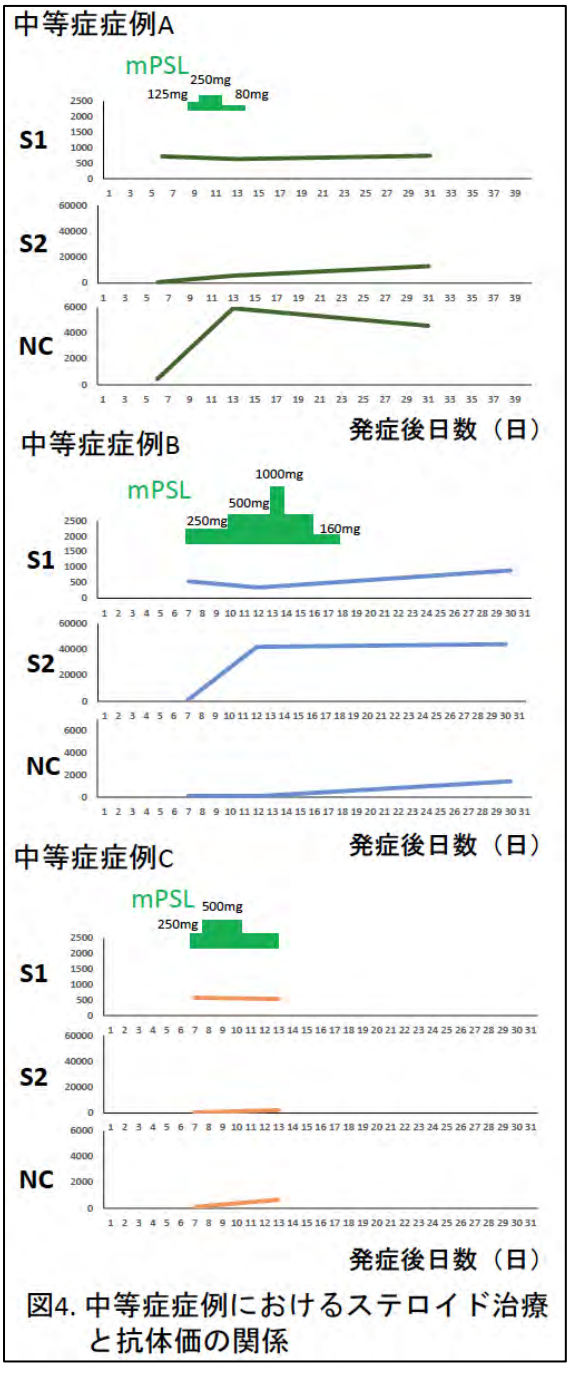


図4. 中等症症例におけるステロイド治療と抗体価の関係

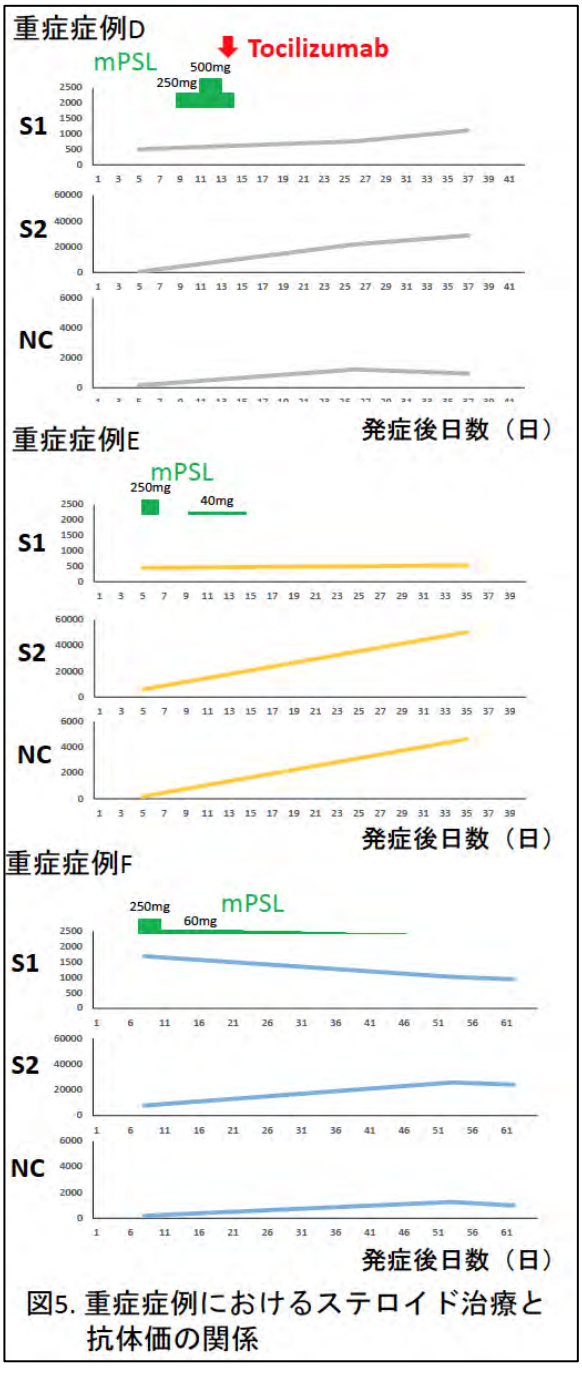


図5. 重症症例におけるステロイド治療と抗体価の関係

５．まとめ

LIPS 法による SARS-CoV-2 抗原に対する抗体価の測定は COVID-19 の病態を反映し、重症化予測に有用である可能性が示唆された。

謝辞

本研究は公益財団法人中谷医工計測技術振興財団のご支援の下に実施しました。御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1) Rapid antibody quantification and generation of whole proteome antibody response profiles using LIPS (luciferase immunoprecipitation systems). Burbelo PD, Ching KH, Mattson TL, Light JS, Bishop LR, Kovacs JA. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 26;352(4):889-95. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.140.
2) Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Reevaluation of confirmatory tests for human T-cell leukemia virus Type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. Transfusion. 2015 Apr;55(4):880-9. doi: 10.1111/trf.12911.

フレキシブルエレクトロニクスを用いたつけ爪型パルスオキシメータの開発

研究責任者　旭川医科大学　医学部
先進医工学研究センター
准教授　　井上　雄介

1．はじめに

新型コロナウィルスに感染した重症患者は数時間で死亡する急性呼吸性窮迫症候群に至り、ECMO による治療が必要となるため、抹消血流と体内酸素飽和度のモニタリングは必須の課題である。現在の指で測る透過型手指パルスオキシメータは血流の阻害となる圧力が指にかかり、徐脈や PCPS の定常流によって脈波成分が減衰した状態では計測が困難となる。そこで我々は爪をアプローチの対象として、圧迫せずに抹消の血流・酸素飽和度を計測可能な新たなセンサ開発を行っている。一方で爪の形は個人差が大きく、形状に合わせたデバイスの開発が求められている。その解決のために我々は東京大学と共同してフレキシブルエレクトロニクスの開発を行っており、その技術を応用して本課題を解決することを起草した。COVID-19 患者のバイタルモニタリングとして、つけ爪型のパルスオキシメータをあらたに開発し、これまでは計測が困難であった弱い脈波でも計測可能な多点センシングの有効性を評価することを本研究の目的とした。

2．方法

我々はつけ爪型の脈波センサを開発してきたが、既存の電子部品は堅いガラスエポキシ基板か、シリコンウエハ上に構成する必要があり、曲面を持つ爪に適用は困難であった。また、爪は個人差が大きくその３次元構造は日本人の中においても大きく形状が異なり、センサの結果にノイズとして影響を与えてきた。そのため、様々な爪の形状にあわせて動作する柔らかいエレクトロニクスの開発が必須の課題であった。そこで、生体に応用可能な様々な、柔らかく生体にフィットするフレキシブルエレクトロニクスを開発することとした。またセンサの有効性と安全性を医学的に評価する。

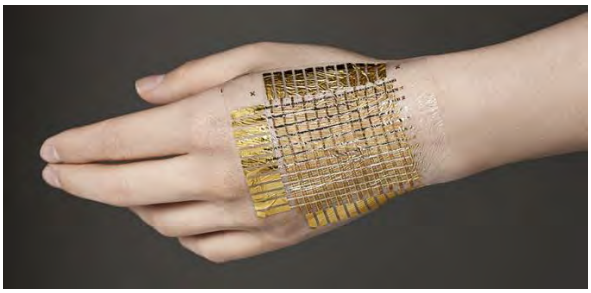


図 1　やわらかく動きのある生体表面に適用可能なフレキシブルエレクトロニクス [1)]

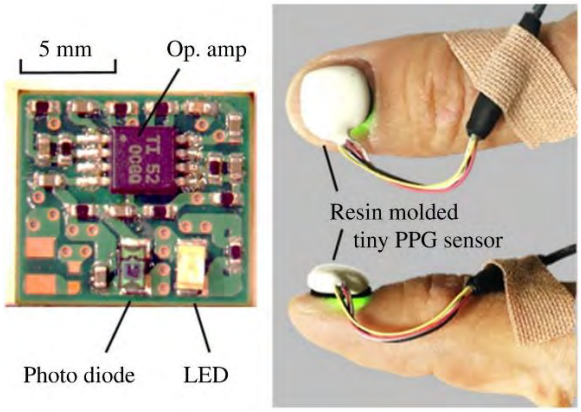


図 2　香川高専と共同で開発中のつけ爪形の脈波センサ [2)]

つけ爪型フレキシブルセンサを有機 LED(O-LED)と有機フォトダイオード(O-PD)によってフレキシブルで生体にフィットするパルスオキシメータを実現し、医学的に安全性と有効性を評価する。

計測時のノイズ対策に関しては、心拍由来以外の体動外乱が信号として重畳される。自己相関、相互相関に着目した解析を行い、外乱信号の除去を試みる。有効性評価は男女の性別毎に広い年代を対象に試験を実施する。倫理委員会への申請と承認を経て厳正に実施する。

3. 成果

薄膜状に構成したフレキシブル半導体 [3]を用いてパルスオキシメータを作製した（図 3)。有機半導体を用いたデイバスは柔らかく伸縮性を持たせることができるため、無機半導体に比べ生体親和性が高く本目的に大変適していることがわかった。また機械的安全性の確保に関しては爪上に構成することは皮膚よりも形状が安定していることも有り、実験に際して十分な強度

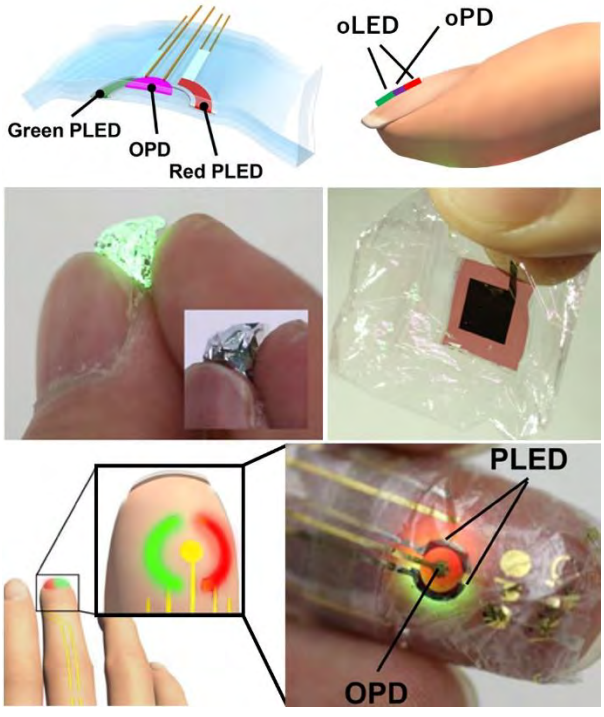


図 3　つけ爪形パルスオキシメータ（上：構成概念図、中：フレキシブル有機材料で作られた LED とフォトダイオード、下：パルスオキシメータ）

寿命が得られた。有機半導体は無機半導体に対して大気安定性に劣ると言われており、空気中の酸素と反応して劣化が生じることも懸念された、また体表の汗などの分泌物に対しても oLED や oPD への影響が懸念されたが、汗腺や代謝のない爪上では皮膚よりもそれらの影響は見られず、本試験の期間においては悪影響が見られなかった。

人を対象とした試験においては、COVID-19 の影響は大きく当初予定して人数での試験は実施できなかったものの、20 サンプルの結果を得ることが出来たのでその一例を図 4 に示す。全被験者で心電図と同期した脈波を検知できた。

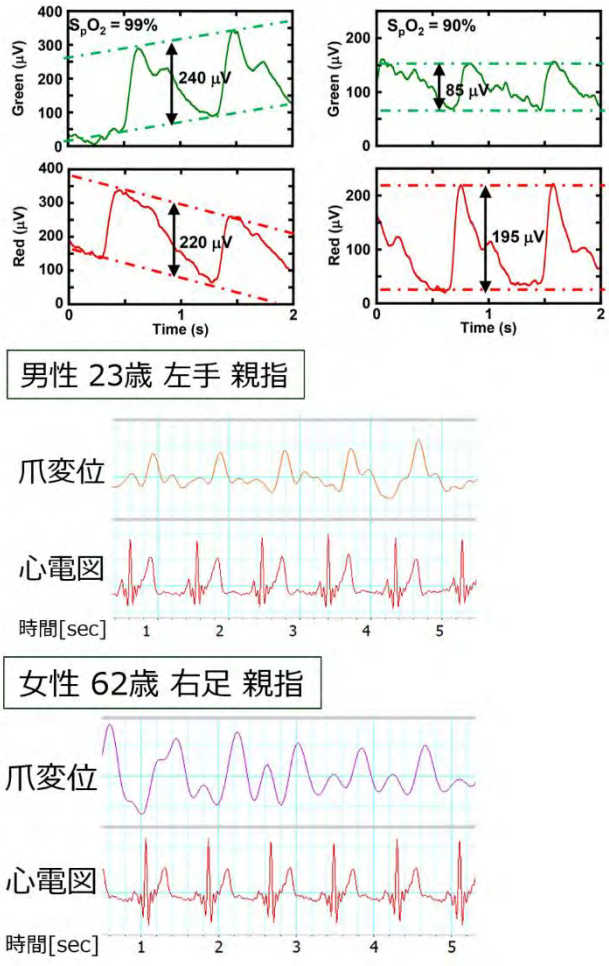


図 4　人を対象とした被験者実験の結果（上：酸素飽和度に対応して、緑色光と赤色光での信号強度が変化し、パルスオキシメータとしての機能を示した結果。下：爪から取得した 20 サンプルのうち、老若男女左右手足それぞれ 1 例ずつを示した結果）

４．まとめ

我々は生体に応用可能な様々な、柔らかく生体にフィットするフレキシブルエレクトロニクスを有機半導体技術を用いて開発し、つけ爪型のパルスオキシメータを開発した。曲面を持つ手指に適用可能であることを確認し、デバイスの強度寿命が十分であることを確認した。本研究成果は生体の中での使用も視野に入れることが出来る可能性があるので、現在開発中の心臓血管外科領域で使用することを想定している、医療材料 [4]との組み合わせて、新たな研究分野の開拓も行うことを検討している。本デバイスを用いた人を対象とした試験の結果からは酸素飽和度に対応した波長毎の信号強度の変化と、心拍に同期した波高の変化を確認し、パルスオキシメータとしての有効性を確認した。現在のパルスオキシメータは赤色光(665nm)と赤外光(880nm)を検知波長として用いているが、赤外光を用いると体温や周囲の温度変化による外乱も大きく影響を受ける。そこで本研究では有機半導体において感度が高い波長領域である緑色光と赤色光を用いることで、新たなパルスオキシメータの原理を模索した。本研究成果はCOVID-19における有効なバイタルモニタリングデバイスになるだけではなく、広く一般的な医療機器として利用可能になる可能性が高く、社会における大きな波及効果が期待できると考えている。

謝辞

本研究は旭川医科大学先進医工学研究センターの教職員 5 名と東京大学大学院工学系研究科の横田知之先生、香川高等専門学校の石井耕平先生との共同研究による成果であり、全研究者の貢献に厚く御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1) 井上 雄介, 特集 : 電気製品へと変わる人工心臓 : 回路実装技術の現在と未来, 電気学会誌, 135 巻, 9 号, p626-628, 2015 年 doi.org/10.1541/ieejjournal.135.626

2) Kohei Ishii, Nobuaki Hiraoka, Nail tip sensor: Toward reliable daylong monitoring of heart rate, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering Vol. 15, Issue 6, p902-908, 2020, doi.org/10.1002/tee.23132

3) Tomoyuki Yokota, Peter Zalar, Martin Kaltenbrunner, Hiroaki Jinno, Naoji Matsuhisa, Hiroki Kitanosako, Yutaro Tachibana, Wakako Yukita, Mari Koizumi and Takao Someya, Ultraflexible organic photonic skin, Science Advances Vol. 2, no. 4, e1501856, 2016, DOI: 10.1126/sciadv.1501856

4) Yusuke Inoue, Tomoyuki Yokota, Tsuyoshi Sekitani, Akiko Kaneko, Taeseong Woo, Shingo Kobayashi, Tomokazu Shibuya, Masaru Tanaka, Hiroyuki Kosukegawa, Itsuro Saito, Takashi Isoyama, Yusuke Abe, Tomoyuki Yambe, Takao Someya, Masaki Sekino, Antithrombotic Protein Filter Composed of Hybrid Tissue-Fabric Material has a Long Lifetime, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 45, p1352–1364, 2017, DOI: 10.1007/s10439-016-1781-5

光架橋性核酸を修飾した磁気ビーズによる RNA 回収および画像判別技術の開発

研究責任者　福井大学　学術研究院
工学系部門繊維先端工学講座
准教授　　坂元　博昭

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、重篤な呼吸困難を引き起こす新たに発見されたヒト感染症である[1-3]。世界保健機関 (WHO) は 2020 年 3 月 12 日に新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクをパンデミックに分類した[4]。SARS-CoV2 は、軽度の症状や無症状の感染者によっても感染が拡大することも知られているため、感染の流行を食い止めるには早期診断と感染者の管理、高度なウイルス検査技術の確立が必要である[5, 6]。

現在 COVID-19 の検査は特異性および感度の点から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により実施されている (Fig.1) [7]。

Fig. 1　PCR 検査の流れ

PCR では患者の検体中に標的ウイルス由来の遺伝子が含まれているかを調べる。PCR による検査での主な問題点は偽陽性・偽陰性が生じることである。

偽陽性になる主な原因は、患者は感染していないがサンプリングの作業中に SARS-CoV2 が混入してしまうことがある。PCR の原理として検体が 1 つでも存在すればそこから標的核酸を増幅させ検出することが可能である。SARS-CoV2 が存在する場所に触れて、その後鼻を触って検査を受けただけで、患者の感染の有無に関係なく陽性となってしまう。

RNA は DNA に比べ不安定で、非常に分解されやすい物質である。RNA を分解する RNase は人間の唾液や汗、空気中のホコリなどにも含まれている。そのため検体処理中での RNase による分解により PCR 検査で増幅されず偽陰性が発生する。

また、検査時に患者が COVID-19 に感染していたとしても、採取した検体に SARS-CoV2 が存在しなければ陰性となる。検体は鼻咽腔拭い液を使用することが主流である[7]。その採取した検体中に DNA や RNA 以外の物質混入している。国立感染研究所のマニュアルに記載のスピンカラムによる抽出では、検体中の総 RNA が回収されてしまうため標的ウイルス RNA、精製物中の標的核酸の濃度が相対的に小さくなる。したがって標的物ではない物質によって標的核酸の濃度の低下や RT-PCR の阻害により偽陰性が発生する。よって標的核酸の抽出・精製では、標的核酸を特異的に捕捉し、標的核酸の濃度が相対的に高くなる方法が求められている。

２．内容

標的 RNA を特異的に捕捉するプローブを修飾

した磁気粒子を用いる方法も開発されている。プローブは標的 RNA と相補的な配列を持つためハイブリダイゼーションによって標的 RNA を捕捉することが可能である。洗浄過程において水素結合に基づいたハイブリダイゼーションによって捕捉された標的 RNA も同時に脱離してしまう (Fig. 2) 。

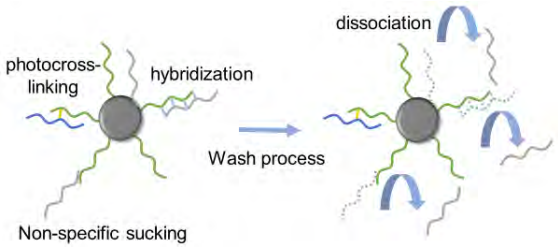


Fig. 2 プローブを利用した核酸回収の課題

水素結合が解離される条件においても標的 RNA を確実に捕捉でき、かつ夾雑物を確実に除去する RNA 回収技術の開発が PCR 検査の感度向上に求められている。

この問題を解決するために、本研究では、光架橋性人工核酸に着目した。光架橋性人工核酸とは、核酸二重鎖間において光照射によりピリミジン塩基に対して架橋し、共有結合することが可能である。そのため水素結合が解消される変性剤や界面活性剤を用いた条件においても標的を捕捉し続ける。この技術の応用により粒子表面やプローブに静電的相互作用や疎水性相互作用によって非特異的に吸着する物質の除去が可能な変性剤や界面活性剤を洗浄操作に用いることが可能となる。したがって、強力な洗浄操作でも標的 RNA を解離させずに確実を捕捉し続け、夾雑物除去が可能である磁気粒子を開発することができると考えられる (Fig. 3) 。この技術の開発により PCR の反応に用いる核酸の抽出・精製で得られる標的核酸の濃度が相対的に高くなり、PCR の精度向上につながる。

本研究では標的 RNA を確実に捕捉でき、かつ夾雑物を確実に除去する光架橋性人工核酸を含むプローブ修飾磁気粒子の開発することで、光架橋性プローブ修飾磁気粒子を用いた高効率な DNA 回収技術の確立を目的としている (Fig. 3) 。そこで標的 RNA と相補的な光架橋性人工核酸を含むプローブを磁気粒子に修飾し、標的 RNA を光照射により共有結合させ RNA の回収効率向上を図る。

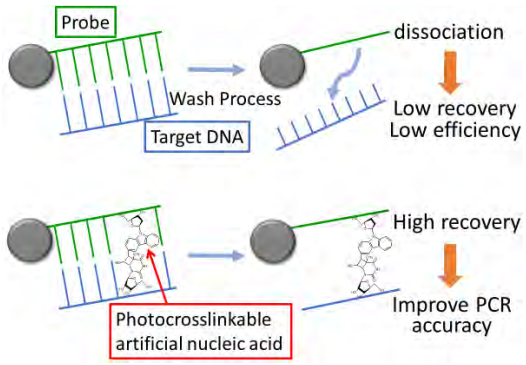


Fig. 3 光架橋性人工核酸を付与したプローブより核酸回収

3. 成果

プローブとは標的核酸に相補的な塩基配列をもつ DNA 断片のことである。プローブを用いることで標的核酸と特異的に結合することによって選択的に標的核酸を捕捉することが可能である。

本研究では、ストレプトアビジンを表面にコーティングした磁気粒子を用いた。アビジンはビオチンに対して非常に高いアフィニティーを持つ。アビジン-ビオチン複合体は既知の非共有結合性相互作用の中では最も強力である (Ka = 10-15M) 。ストレプトアビジンは、最大 4 個のビオチン分子に結合することが可能である。また、ビオチン標識は安定性が高く小型であるため、標識分子の機能性をほとんど阻害しない。アビジン-ビオチン複合体は一度複合体を形成すると、pH、温度、有機溶媒や変性剤の影響を受けにくいことが知られている。

本研究では、5’末端にビオチンを修飾した光架橋性人工核酸を含むプローブを用いて、ストレプト

アビジンコートの磁気粒子に結合させプローブ修飾磁気粒子を作製した。この磁気粒子を用いて選択的に標的核酸の捕捉・回収実験を行い、標的核酸の回収効率の向上を図る。

本研究では、3-cyanocarbazole-modified nucleotide (CNV-K) を含む光架橋性人工核酸を用いた (Fig. 4) 。

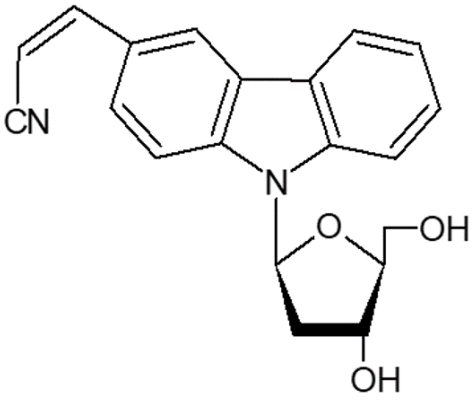


Fig. 4 光架橋性人工核酸 CNV-K の化学構造

CNV-K を含むオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は 366 nm で 1 秒間照射することで光架橋させることができる (Fig. 5) 。

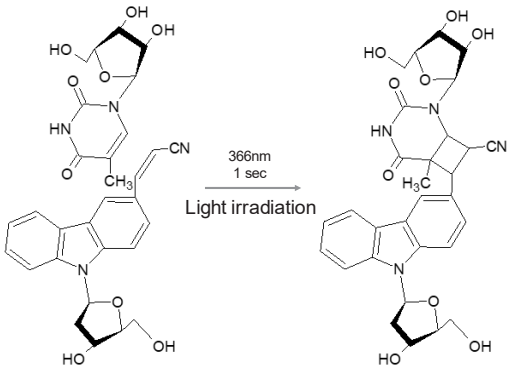


Fig. 5 CNV-K の光架橋反応

CNV-K は核酸二重鎖間において光照射によりチミンに対して架橋することが可能である。光架橋性核酸を含むプローブは標的核酸とハイブリダイゼーションさせ、水素結合させた後、光照射により光架橋性人工核酸の炭素間の二重結合とチミンの C5-C6 の二重結合に対して［2＋2］シクロ付加により光架橋反応が進行してシクロブタン構造の共有結合を形成する[8]。

標的 DNA は SARS-CoV2 のヌクレオカプシドタンパク質の塩基配列の一部を使用した。

Table1 1 に示したサンプルに対してアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 6 に示す。

Table 1 PCR sample

	Target	Particle	Probe	Light
(a) Positive control	+	-	-	-
(b) Recovered target DNA	+	+	+	+
(c) Unmodified probe	+	+	-	+
(d) No light irradiation	+	+	+	-

電気泳動の結果、(a) Positive control と (b) Recovered target DNA は 80 bp 付近にバンドが確認された。一方で、(c) Unmodified probe と (d) No light irradiation はスメアが確認でき、バンドは確認できなかった。

(c) は標的 DNA を捕捉できるプローブがついていないため、標的 DNA を捕捉・回収できなかったと考えられる。また、磁気粒子表面に非特異的に吸着している可能性が存在したが、界面活性剤による洗浄によって除去され、粒子表面には非特異的に吸着していないと考えられる。

(d) は光照射による共有結合が形成されていないため、変性剤と界面活性剤による洗浄によって水素結合が脱離し、標的 DNA を捕捉・回収できなかったと考えられる。

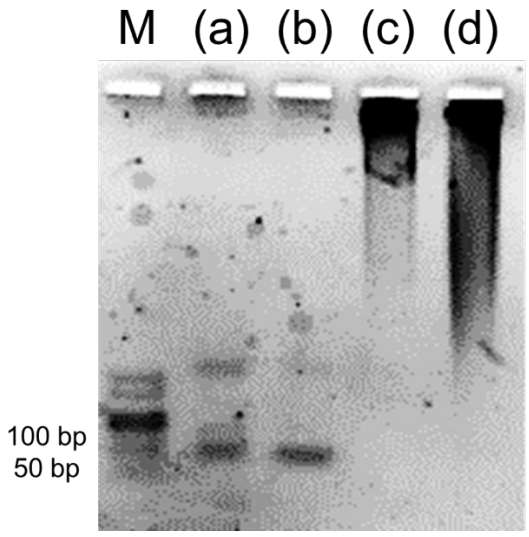


Fig. 6 標的核酸回収後の電気泳動

実際の核酸の抽出では、タンパク質や他のウイルス性の核酸なども存在しているためプローブとの相補的な結合を阻害することが考えられる。よって標的 DNA 以外の物質を実験の系に加えることにより実際の系に近い条件で実験を行った。今回は標的 DNA に用いているのは短い DNA 断片であるため、塩基配列の異なる短い DNA 断片を夾雑物に選択した。したがって、抽出した MRSA のゲノム DNA を超音波で切断したものを夾雑物として使用して同様の実験を行った。

夾雑物混入条件に対して Table 1 示したサンプルに対して E-Gel Power Snap 電気泳動システムによるゲル電気泳動の結果を Fig. 7 に示す。(a) と (b) には 80 bp 付近にバンドが確認された。しかし、(a) と (b) に比べ薄いが、(c) と (d) にもバンドが確認できた。このバンドは洗浄不足によるものだと考えた。したがって、夾雑物混入条件の (b) (c) (d) においてリアルタイム PCR で回収効率の確認を行った。

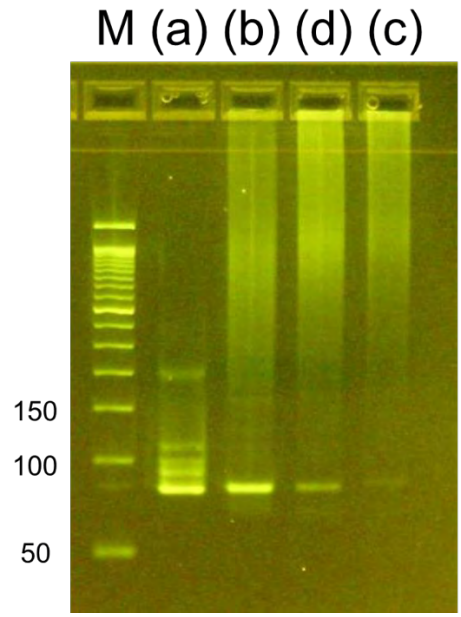


Fig. 7 夾雑物混入時における標的核酸回収後の電気泳動

リアルタイム PCR は PCR 反応によって増幅する DNA 断片を計測できるためどの程度系内に標的 DNA が存在するかを確認することができる。したがって、夾雑物混入条件のバンドの濃淡の差を数値的に測定するためにリアルタイム PCR を用いて実験を行った。

(b) (d) はサイクル数を大きくしていくと蛍光強度の蛍光強度の増加が確認できた。(c) は (b) と (d) のサンプルに比べて蛍光強度の増加が確認されなかったため、ゲル電気泳動の結果確認されたバンドは標的 DNA 由来のバンドでないと考える。(b) (d) の両サンプルの算出したベースラインに対して統計学的に有意な増加がみられる Ct 値を Table 2 に示す。Table 2 の Ct 値を比較すると 0.41 の差が確認された。PCR は 1 サイクルごとに 2n (n = サイクス数) ごとに鋳型 DNA は増加していく。光架橋性人工核酸を用いた (b) は今回の実験で Ct 値が 0.41 の差があることから、20.41 = 1.33 倍 (d) に比べ DNA の濃度が濃かったことが分かる。したがって、光架橋性人工核酸を含むプローブを用いることで DNA 回収効率を 1.33 倍向上できたことが分かった。この 1.33 倍の差は元々収率の高いプローブを用いた抽出方法と比較を行っ

たため、十分な差であると言える。

Table 2 Real time PCR threshold cycle

	Threshold cycle
(b) Recovered target DNA	17.68
(d) No light irradiation	18.09
(c) Unmodified probe	-

４．まとめ

本研究では標的 RNA を確実に捕捉でき、かつ夾雑物を確実に除去する光架橋性人工核酸を含むプローブ修飾磁気粒子の開発することで、光架橋性プローブ修飾磁気粒子を用いた高効率な RNA 回収技術の確立を目的とした。本研究では、標的 DNA と相補的な光架橋性人工核酸を含むプローブを磁気粒子に修飾し、標的 DNA を光照射により共有結合させ DNA の回収効率向上を図った。

光教性人工核酸を含むプローブを用いることで DNA の回収効率を向上させることができ、変性剤や界面活性剤による洗浄によっても標的 DNA を捕捉し続け回収できた。夾雑物混入条件においても同様に標的DNA を捕捉、回収ができた。この事から、光教性人工核酸を含むプローブは選択性があることが確認できた。しかし、抽出したゲノム DNA を用いて実験を行ったため、より実際の抽出条件に近い条件での実験も必要である。

リアルタイム PCR によって標的 DNA の定量的な測定を行った。光架橋性人工核酸を含むプローブを用いることで光照射を行わなかったサンプルに比べ 1.33 倍多く回収できることが分かった。

本技術は、新型コロナウイルス感染症以外のウイルス性の感染症や疾患なども標的核酸の塩基配列が分かれば、プローブを設計し用いることができる。したがって、今後は RNA や二重鎖 DNA をサンプルに用いた研究が必要である。また、今回用いた PCR と電気泳動やリアルタイム PCR などによる検出方法は専門の機器が必要であり、検出に時間がかかるのでより簡便で短い時間で検出が可能な方法が考えられる。したがって、本研究室で研究されている画像解析による検出方法の確立を考えている。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団からの研究助成により行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。

参考文献および発表論文

1. N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, N Engl J Med, 382 (2020)
2. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y. M.; Wang, W.; Song, Z. G.; Hu, Y.; Tao, Z. W.; Tian, J. H.; Pei, Y. Y.; Yuan, M. L.; Zhang, Y. L.; Dai, F. H.; Liu, Y.; Wang, Q. M.; Zheng, J. J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y. Z. Nature 2020, 579, 265- 269, (2020)
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-nCoV and Naming It SARS-CoV-2. Nat. Microbiol. 2020, 5, 536- 544, (2020)
4. WHO. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Situation Report - 69. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200329-sitrep-69-covid-19.pdf?sfvrsn=8d6620fa_4 (accessed 2021-01-11).
5. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update,

weekly_epidemiological_update_22.pdf, (accessed 2021-01-11).
6. Duaa W. Al-Sadeq, Gheyath K. Nasrallah, International Journal of Infectious Diseases, Volume 98, Page 372-380, (2020)
7. 国立感染研究所、病原体検出マニュアル 2019n-CoV Ver 2.9.1
8. Y.Yoshimura, K.Fujimoto, ORGANIC LETTERS, Vol. 10, No. 15 3227-3230, (2008)

学会発表

“光架橋性プローブ修飾磁気粒子を用いた高効率な RNA 回収技術の確立”， 矢嶋修登, 向當綾子， 坂元博昭, 髙村映一郎， 末信一朗, *日本化学会 第 101 春季年会*(2021)

不活化ウイルスの RNA 直接検出による感染検査の高速化

研究責任者　広島大学大学院統合生命科学研究科
生物工学プログラム
教　授　　岡村　好子

1．はじめに

本研究を着想した 2020 年 4~5 月頃、世間では全員 PCR 体制の整備を熱望していた。PCR という専門用語を一般の方が口にするようになったことに驚きを感じた。一方で PCR は誰もが簡単に扱えるという誤った認識が先行していることに懸念を抱いた。PCR を含む遺伝子増幅法は、対象 DNA を数百万倍に増幅できるなど高感度である一方で、混入物に敏感で、当該反応以前の生成物キャリーオーバーや空気中の飛沫など、反応系の外から入ってくる DNA による汚染（コンタミネーション）が問題となる。例えば、陽性コントロールとして利用するプラスミドが反応系に 1 コピー混入しただけで、偽陽性が生じ、結果の解釈を誤らせる可能性がある。そのため遺伝子増幅法をベースとした方法を臨床検査等で使用する場合は細心の注意が必要であり、管理された清浄空間と技術に熟知した検査技師が必要となる。さらに新型コロナウイルス SARS-CoV2 の扱いは当初バイオセーフティレベル 3 (BSL3)が必要で、実験室にオートクレーブと生物学用安全キャビネットの設置が義務づけられ、さらに前室にエアシャワーを設置、実験室からの排気は高性能フィルターを通し除菌した上で大気に放出することを求められている。また、技師が感染のリスクに晒されないよう、ウイルスを不活化する変性剤がある中で反応が進行する検査方法である方が安心安全である。

このような制限と律速の事情があり、我々は、一般人が安易に行うべきものではない、と考えながらも、工学者としては PCR の課題を解決し人々の安心安全に役立つ方法に自らの技術が適用できるかどうか考えた。

我々が開発した RNA 直接検出法（RNaseH-assisted RCA; RHa-RCA）[1] は、検出すべき RNA 自体が増幅反応の開始プライマーになるため、既報のウイルス検出法とは全く異なり、擬陽性は生じない。さらに、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)を併用するために、細菌体内で RHa-RCA 反応を行い、1 細胞レベルで mRNA 発現を可視化できる RHa-RCA—FISH[2] も開発してきた（図１）。

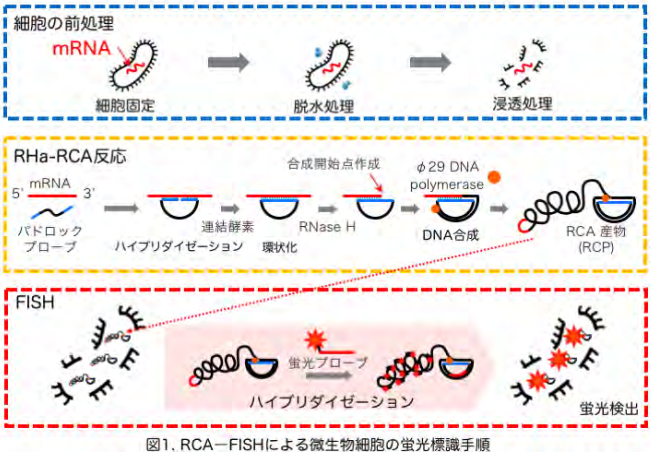


図1. RCA—FISHによる微生物細胞の蛍光標識手順

本手法を SARS-CoV2 検出に応用した場合、細胞固定のためのパラホルムアルデヒドを使用しても核酸増幅は進行することから、被験者か

ら採取した検体付着スワブをホルマリンやアルコール等不活化剤入りのサンプル管に回収すれば、ウイルスは即時に不活化され、検査時の防護服の使用、BLS3 レベルの検査室などの制限を緩和できると着想し、本研究では、検査技師の熟練度に依存しない簡便なプロトコルに改良することを目的としてその反応工程を検討した。

２．実験材料および方法

2-1. ウイルス感染細胞のモデル

当研究室では感染性のあるウイルスおよびその関連細胞等を扱えないため、アフリカミドリザル腎臓線維芽細胞株(COS 細胞)の内在性の RNA を検出対象として、ウイルス感染細胞内のウイルス RNA 検出モデルとした。COS 細胞は DMEM (+10% FBS)に初期細胞数が 1×10^5 cells となるように培養液を添加し、72 時間培養した。

2-2. 検出プローブ設計と検出配列の *in vitro* 合成

COS 細胞から全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。*actb* 遺伝子の配列を決定し、認識するパッドロックプローブ (PLP)を設計した。また、PLP の骨格配列を認識する FISH プローブには Alexa488（顕微鏡観察用）または Alexa568（蛍光スキャナ用）を修飾した。検出配列のコピー数のキャリブレーションのために、*actb* の cDNA を T7プロモーター制御下に連結した発現ベクターを構築し、*in vitro* 転写した mRNA (IVT)を調製した。IVT の濃度を測定し、定量測定の検量線に使用した。

2-3. *in vitro* RHa-RCA

設計した PLP の検出限界を評価するために、2-2.で調製した濃度既知の IVT を用いて RHa-RCA を行った。300 pmol の PLP、3 µL 10×T4 PNK buffer (200 mM トリス酢酸、500 mM グルタミン酸カリウム、100 mM 酢酸マグネシウム)、1 mM ATP、10 units T4 polynucleotide kinase（タカラバイオ株式会社）を混合し、最終量を 30 µL とした。この混合溶液を 37℃で 1 時間インキュベートすることで PLP をリン酸化したのち、65℃で20分間加熱することによりキナーゼを失活させた。

IVT、250 fmol のリン酸化した PLP、1 µL 10× Oligonucleotide annealing buffer (200 mM トリス酢酸、500 mM グルタミン酸カリウム、1mM EDTA)を混合し、最終量を 10 µL とした。この混合溶液を 95℃で 2 分間、45℃で 3 分間、30℃で 10 分間インキュベートすることでハイブリダイゼーションを行った。その後、1 µL 10×Ligation buffer (200 mM トリス酢酸、500mM グルタミン酸カリウム、200 mM 酢酸マグネシウム)、800 µM ATP、2 mM DTT、12.5 units SplintR ligase（New England BioLabs）が含まれている反応液 10 µL を混合した。ライゲーション反応は、37℃で 1 時間インキュベーションすることで行い、65℃で 10 分間加熱してリガーゼを失活させた。次に、1.8 µL 10 ×buffer for SpRCA-1T (300 mM トリス酢酸、500mM グルタミン酸カリウム、300 mM 酢酸マグネシウム、800 mM 硫酸アンモニウム)、2 mM dNTPs、200 ng phi29 DNA polymerase（関東化学株式会社）、0.06 units RNase H (BioAcademia)、0.01 units Pyrophosphatase（New England BioLabs）、2×SYBR GreenⅡ（Invitrogen）が含まれている反応液 20 µL を混合した。RCA 反応は、30℃で 2 時間インキュベートすることで行った。その間に Thermal Cycler Dice® Real Time SystemⅡ（タカラバイオ株式会社）を用いて、RCA 産物の増幅を 10 分ごとに Real-time 測定した。反応終了は 65℃で 10 分間加熱して酵素を失活させた。PCR 産物にハイブリダイズした SYBR Green II の蛍光は FAM 用のフィルター(励起波長 482 nm、蛍光波長 536 nm）で測定した。

2-4. qPCR

2-2.で調製した cDNA を使用し、*actb* 遺伝子の 785~1027 nt 領域を増幅するプライマーで qPCR を行った。qPCR には THUNDERBIRD NEXT

SYBR qPCR MIX (TOYOBO)を使用し、2-2.で調製した濃度既知の IVT を用いて検量線を作製した。2-3.と同様に SYBR Green II の蛍光を測定した。

2-5. 変性剤を使用した RHa-RCA-FISH 反応条件

遠心回収した COS 細胞を 4%パラホルムアルデヒド（室温）に浸漬して固定化した。・細胞透過化には、99.5% エタノールに 15 分間浸漬、あるいは、70, 85, 99.5% エタノールに 5 分間ずつ浸漬の 2 条件を検討した。浸漬後、PBS で洗浄した。

in situ で行う RHa-RCA には、20 pmol のリン酸化した PLP、5 µL 10×Hybridization buffer (200 mM Tris-HCl（pH 7.5）, 50 mM 塩化マグネシウム, 300 mM 塩化カリウム)と 10µL ホルムアミドを混合し最終量を 50 µL としたハイブリダイゼーション溶液中に透過化後の細胞を浸漬した。PLP のハイブリダイゼーションは、95℃→32.5℃ゆっくりと冷却、あるいは、55℃で 15 分間→45℃で 2 時間の条件で行った。次に、6.25 µL 10×Ligation buffer、1.2 mM ATP、3 mM DTT、25 units SplintR ligase を含む反応液 50 µL を混合し、37℃で 10 分間インキュベートすることでライゲーションを行った。最後に、5.6 µL 10×buffer for SpRCA-1T、2.0 mM dNTPs、1.25 ng phi29 DNA polymerase 、0.03 units RNase H 、0.004 units pyrophosphatase を含む反応液 50 µL を混合し、30℃でインキュベートすることで RCA 反応を行ったのち、0.5M EDTA による反応の停止を行った。以上の反応はすべてスライドグラス上で行った。

FISH プローブのハイブリダイゼーションは、40 µL 5×saline sodium citrate（SSC）と 10 µL の 10 µM FISH プローブを混合し、37℃で 3 時間インキュベートすることにより行った。100 µL 1×PBS で 37℃、15 分間インキュベートすることで余剰のプローブを洗浄した。尚、洗浄は 2 度行った。最後に、20 µL の 50 µM DAPI-PBS をマウントして核を染色し、Keyence BZ-X800（キーエンス社）を使用して蛍光観察した。

2-6. 96-ウェル限外ろ過膜上での RHa-RCA-FISH

2-5.の工程を限外ろ過膜上で実施することで、洗浄・反応にかかる液交換を簡便化し、自動分注器の使用を可能にするフォーマットを策定した [3]。

使用した限外ろ過用プレートはアクロプレップ アドバンス 96-ウェル フィルタープレート限外ろ過用（PALL 社製、Omega 100K MWCO, #8036)、同じく PALL 社製マルチウェルプレートバキュームマニフォールドで吸引ろ過した。手順の概要を図 2 に示した。反応終了後の 96-ウェル フィルタープレートに残存する蛍光は、蛍光プレートリーダー Fluoroskan Ascent FL (ThermoFisher Scientific 社)を使用して測定した。

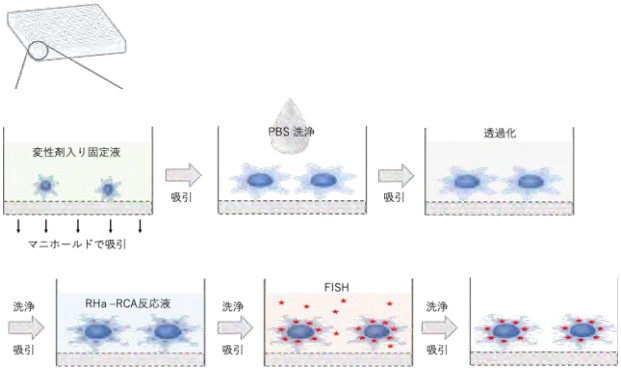


図 2　限外ろ過膜上でのRHa-RCA-FISHの手順

3． 結果および考察

3-1. 検出用 PLP の評価

in vitro RHa-RCA による 1 本鎖 DNA の増幅を蛍光シグナル強度によって測定した結果、10fmol (6.0×10^9 分子)の mRNA を検出可能であることが示された（図 3）。qPCR サーマルサイクラーに搭載されている蛍光検出器の感度がおよそ 10^{10} 以上のフルオロフォアであるため、この検出方法で評価できる最大感度は得られたと考えている。また、SYBR Green II の蛍光で検出する場合、S/N 比が明確に区別できる所要時間は 1 時間であることも示された。

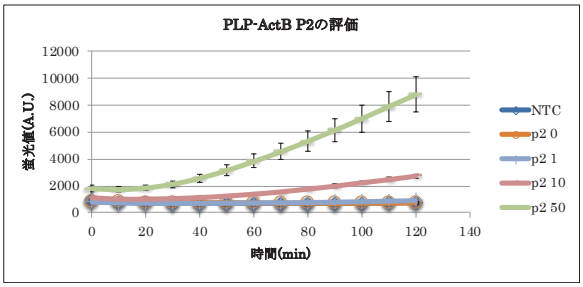


図３ *actb* IVT に対する *in vitro* RHa-RCA. NTC: No template control.

3-2. 変性剤を使用した RHa-RCA-FISH 反応条件の策定

4%パラホルムアルデヒド（室温）に浸漬して固定化した細胞の透過化を２条件で検討した結果、99.5% エタノールに 15 分間浸漬の方は細胞膜が粗面になり乾燥が激しかった。エタノール濃度を徐々に上昇させた条件では乾燥を防ぎ細胞ダメージも少なかったため、後者を採用した。

PLP のハイブリダイゼーション条件も２通り行い、FISH まで行って評価した結果、95℃→32.5℃ゆっくりと冷却の条件では蛍光が全く見られなかったが、55℃で 15 分間→45℃で 2 時間の条件では FISH の蛍光が観察されたため、前者では PLP が mRNA にうまくハイブリダイズせず RCA 反応が開始されなかったと結論された。

それぞれの選ばれた条件で、RNA 分子に由来する RCA 産物(RCP)を可視化した結果、図４に示すとおり、FISH プローブの Alexa488 蛍光が細胞質いっぱいに観察された。

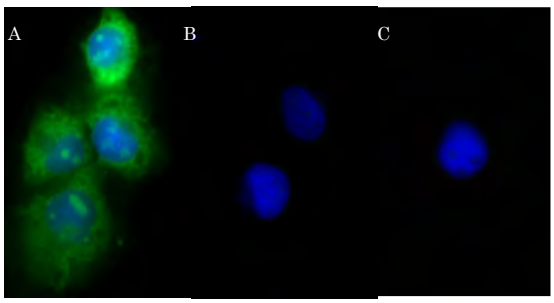


図４　変性剤で固定化した COS 細胞中の RNA 分子を RHa-RCA-FISH で可視化．緑蛍光：Alexa488（FISH プローブ由来），青蛍光：DAPI（核由来）．
A: RHa-RCA-FISH で *actb* 遺伝子の mRNA が可視化された細胞
B: 透過化処理後 RHa-RCA 反応なしで FISH した細胞 （FISH プローブは非特異的に吸着しないことを示すコントロール）
C: 細胞透過化処理のみを行なった細胞

蛍光強度が低いところを見ると顆粒が識別できるため、RCP は RNA 1 分子に対し 1 顆粒として生じるが、その顆粒が多数重なり合って個数を計測できない状態になっていることが示された。すなわち、qPCR サーマルサイクラーに搭載されてる蛍光検出器の感度では 1 時間以上の反応時間が検出感度をクリアするために必要だが、FISH による蛍光プローブ集積では、反応時間の短縮が可能であることが示唆された。

なお、qPCR によって見積もられた COS 細胞 1 個あたりの *actb* 遺伝子の発現量は 3,200±76 コピーだった。

3-3. 96-ウェル限外ろ過膜の適用

RHa-RCA-FISH のメリットは細胞内で反応するため、RNA 抽出工程が不要であり、蛍光が顆粒として高度に集積するため、SYBR Green II より高感度化が可能である。しかし一方で、細胞像を蛍光顕微鏡で観察し、蛍光顆粒をカウントすることは観察者の負担になってしまうため、96 ウェルの蛍光スキャナを使用した検出が可能かどうかを検討した。そのため、96-ウェルフィルタープレートをフォーマットとし、未反応蛍光プローブを除去できる限外ろ過膜を使用することにした。

これによって、反応液の投入、液交換、洗浄において毎回遠心分離を行ってきた工程を減圧吸引で簡易化することが可能であり、研究室に配属されたばかり 4 年生の学生でも簡単に反応を実施することができた。その結果を図５に示す。細胞を投入し、透過化処理の有無で反応の有無を区別したところ、透過化処理なしの細胞は細胞の形を維持することで、ウェル底面を被覆してしまい、投入した FISH プローブが滞留してしまった。図５(B)に解説したように、目詰まりした結果、FISH 反応液が引き抜けず、未反応プローブが残存したため、Alexa568 由来の赤色蛍光が計測された。一方、細胞透過化区分では、細胞膜が崩れ細胞内容物が漏出、100 kDa 以下の分子は全て吸引ろ過されたため、未反応プローブも除去されたと見なされた（図５ (A)）。RCP は 100 KDa より十分に大

きい分子であるが、おそらく図５(B)に解説したように、ウェル底面に散在してしまい、蛍光計測がうまくいかなかったようである。フィルター上に残ったわずかなろ液を回収して顕微鏡で観察すると蛍光顆粒が観察されたことから、当研究室保有の蛍光プレートリーダーは、液体に拡散する蛍光でないと測定できないことが分かった。34 kPa の圧力で透過化細胞が崩壊し、蛍光顆粒が露出する形式であれば、次世代シークエンサーに搭載されているような蛍光画像解析装置で蛍光顆粒を計測することで解決可能であり、また分子数カウントも同時に達成できる。本研究を実施することによって改良ポイントが明確になり、誰でもオペレートできる、スループット性の高い全自動検査機器への発展が見込まれた。

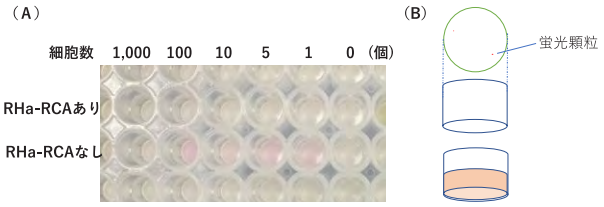


図５（A）限外ろ過膜上でのRHa-RCA-FISH後のウェルの中
（B）各ウェルの模式図
上段：透過化処理あり　下段：透過化処理なし

４．まとめ

本研究は、PCR による核酸増幅試験の課題を解決するために、RNA を直接検出する RHa-RCA 法を基盤技術として、SARS-CoV2 の検査への応用に向けて、セーフティレベルや検査技師の熟練度に依存しない「どこでも・だれでも」オペレートできる工程の開発を目指した。細胞内の mRNA を *in situ* で直接検出すること、96-ウェル限外ろ過膜を適用してスループット性を向上させることを目的に RHa-RCA 法を改良することに成功した。ほ乳細胞は細胞膜が弱く、蛍光顆粒が細胞から露出して散在するという新たな知見が得られ、今後は検出機器の変更によって、計測感度がさらに向上することが期待された。

謝辞

本研究は、中谷医工計測技術振興財団の緊急支援　新型コロナウイルス感染症対策助成プログラムの助成のもとに行われました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献および発表論文

1) Takahashi H, Ohkawachi M, Horio K, Kobori T, Aki T, Matsumura Y, Nakashimada Y, Okamura Y, ″RNase H-assisted RNA-primed rolling circle amplification for targeted RNA sequence detection,″ *Scientific Reports,* 8, 7770. (2018)

2) Takahashi H., Horio K., Kato K., Kobori T., Watanabe K., Aki T., Nakashimada Y., Okamura Y.* Direct detection of mRNA expression in microbial cells by fluorescence in situ hybridization using RNase H-assisted rolling circle amplification, *Scientific Reports,* 10, 9588. (2020)

3) （特許出願）岡村好子、高橋宏和、堀尾京平「生存細菌の検出方法及びそのためのキット」（特願 2020-128968）2020 年 7 月 30 日

nCoV の RNA 複製酵素を前処理に用いた、その検査の開発
「敵の武器を逆利用」

研究責任者　千葉大学医学部附属病院
検査部
講　師　　西村　基

１．はじめに

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の効果的な予防・治療の確立されていない現在、その検査の改善は喫緊の課題である。標準検査法は qPCR といってよいが、なお感度の問題がある。一方、SARS-CoV-2 は RNA ウイルスであり、自らのコードする RNA 依存性 RNA 合成酵素で効率的にその遺伝情報を複製すると考えられている。本研究では、このウイルスが武器とする RNA 合成酵素を合成し検査前処理に用い、検査感度を向上する事を企図した。

２．内容・３．成果

いただいた助成により、千葉大学医学部附属病院検体を含めた抽出核酸より SARS-CoV-2 の全ての遺伝子のタンパク質コード領域を取得した。

これらの中には、当然ながら RNA 依存性 RNA 合成酵素(Rdrp)が含まれる。当初の計画においてはこれを大腸菌などで人工合成を行い、合成 Rdrp に、その天然の基質とする SARS-CoV-2 RNA を複製させて、検査の前処理とする予定であった。

しかしながら、SARS-CoV-2 Rdrp を用いた研究の報告が並行して複数なされ、いずれも SARS-CoV-2 Rdrp の RNA 合成活性を部分的には再現できているが、伸長性を含めポリメラーゼ能力としては弱いもので、示された実験条件では、とても検査前処理に供するほどの性能が見込めないと判断せざるを得ない内容を含む発表であった（参考文献 [1]など)。これは他のウイルス、例えば、やはり RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルスにおいて、かなり早期より、強い伸長性を伴って Rdrp ポリメラーゼ活性が再現されたケースとは明確に異なっている。C 型肝炎においては、このような再現実験を基に HCV Rdrp を標的に画期的新薬の登場が続いているが、同様の治療薬の開発は COVID-19 においては難航が予想される。

ここにおいて感度向上という開発の目的に戻り、Rdrp ではなく phi29 という別なウイルス（バクテリオファージ）由来のΦ29DNA ポリメラーゼを前処理に用いる酵素として採用した。この酵素による核酸増幅は WGA(全ゲノム増幅)で実績があり、市販品として入手が可能であることが大きな理由である。

じっさい、取得した SARS-CoV-2 遺伝子をコントロールにした PCR 感度向上の予備的検討は良好な結果であった。よって実際の COVID-19 検査において、次のようにΦ29DNA ポリメラーゼによる検査前処理を行った。すなわち、COVID-19 変異型別判定シーケンシング検査において、従来法では RT-PCR でターゲット領域が増幅できなかった、いわゆる Ct 値が高く（約 30-38）検査不可能であった 3 検体について、Φ29DNA ポリメラーゼによる前処理を行ったところ増幅が可能であり型別の推定が十分に可能であった。

４．まとめ・謝辞

Ct値30-38というのは最も感度の高いCOVID-19検査と言われるPCR検査においても、ほぼ感度の限界に近く、Φ29DNA ポリメラーゼによる検査前処理は陽性検体におけるシーケンシングを広く可能にできると考えられる。実際に上記で解析した高 Ct 値群・３検体は、集団感染における検体であるが、その中で型別判定ができず、同一株によるものか、本当に集団感染に由来する検体と判定してよいかの推定目的を含めて型別判定の必要性がありながら、不可能であった検体であった（本解析により同一株と推定できた；図１）。

このように中谷医工計測技術振興財団より頂いた研究助成により、既に実臨床のレベルにおいて、目的としていた検査感度向上は達成の目処がたったと言える状況であり、ますます本稿の執筆時点（オリンピック開会式直後）において感染が拡大する現在において振り返っても、極めてタイムリーな助成を頂いたものであり、誠に深く感謝を申し上げます。

発表論文

準備中

参考文献

1) Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase, Nature 584, 154–156 (2020).

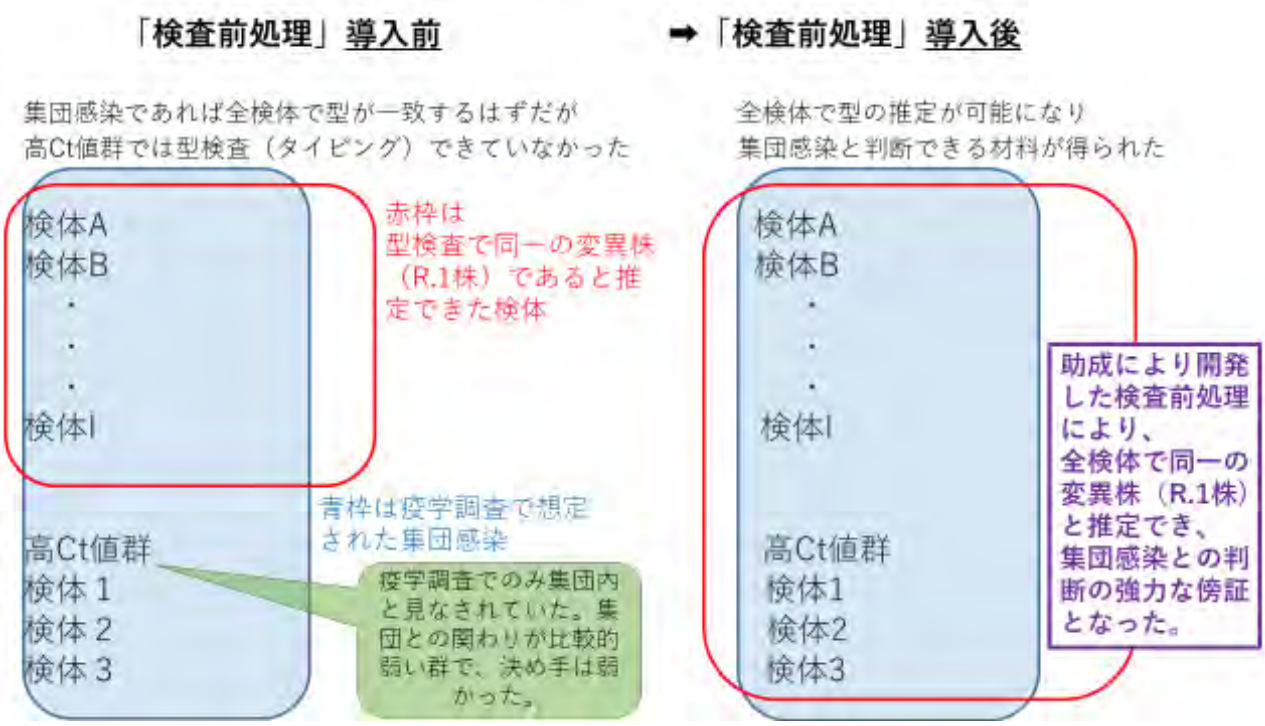


図１

新型コロナウイルスに対する中和抗体誘導と肺炎重症化に関する研究

研究責任者　神戸大学大学院医学研究科
附属感染症センター臨床ウイルス学分野
教　授　　森　康子

１．はじめに

2019 年 12 月に発生した新型コロナウイルス感染症 COVID-19 は、全世界に広がるパンデミックとなり、日本でも 2021 年 7 月時点で第五波となると予想される急速な感染拡大が起こっている。我々の研究グループでは日本での第一波に当たる 2021 年 4 月から、兵庫県立加古川医療センターを始めとした兵庫県下の医療施設との共同研究を行い、兵庫県における感染状況の把握や、感染に伴う COVID-19 患者の免疫応答について解析を行ってきた。本研究では、患者血清中の Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) に対する中和抗体とサイトカインの量を経時的に調べ、重症度との関係性について解析した。

２．内容

兵庫県立加古川医療センターで PCR 検査によって COVID-19 と診断された患者 15 名から血清の提供を受け、症状を示さない無症候感染者、肺炎を伴わず発熱や上気道炎のみの軽症、酸素投与処置を要しない肺炎を呈する中等症、酸素投与処置を要する肺炎を伴う重症、そして人工呼吸器による処置が必要となる超重症に分類した。本研究の対象者は、無症候感染者 5 名、重症患者 3 名、超重症患者 7 名であった。重症患者及び超重症患者からは複数回にわたって血清の提供を受け、経時的な変動を追跡した。陰性対照として、イムノクロマトテストキット(2019-nCoV Ab Test; INNOVITA)を用いて抗体陰性であると確認された健常ボランティア 17 名から血清の提供を受けた。

中和抗体価の測定には、実際の病原体である SARS-CoV-2 を用い、神戸大学大学院医学研究科附属感染症センターに設置の BSL3 レベル実験室を利用して厳重な管理の下で実施した。SARS-CoV-2 の感染に適した TMPRSS2 発現 Vero 細胞に対して、段階的に希釈した血清と混合したウイルス溶液を加え、感染を阻止できる最大の希釈倍率を中和抗体価とした。

血清中のサイトカインの量の測定には Bio-Rad 社の Bio-Plex 200 システムを用いた。Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening 48-Plex Panel キットを用いて 48 種のヒトサイトカインを同時に定量測定した。サイトカイン量に関しては健常ボランティア 2 名、無症候感染者 1 名、重症患者 3 名、超重症患者 7 名から得られた血清を解析した。

３．成果

COVID-19 と診断された無症候感染者 5 名、重症患者 3 名、超重症患者 7 名について血清の中和抗体価を測定した結果、全ての血清で中和活性が認められた。一方で陰性対照である健常ボランティアの血清では中和活性は全く見られなかった。この事から、感染に伴って特異的な液

性免疫が誘導されている事が確認できた。重症度毎の中和抗体価を比較した結果、無症候感染者血清の中和抗体価が3-27倍であるのに対して、重症患者、超重症患者では各患者の最大値で81-2187倍であり、より中和抗体価が高い傾向が認められた。この事から感染者ではその重症度によって誘導される中和抗体の量に差があり、重症患者ではより多くの中和抗体が誘導される事が示された。

各患者の経時的な中和抗体価の変動を解析した結果、発症後 4-10 日にかけて中和抗体価が徐々に上昇する傾向が認められた。また一部の例外を除いて、PCR で陰性と診断された時点では既に中和抗体が誘導されている事が示された。このことから、中和抗体の誘導によって体内からウイルスが除去されている可能性が示唆された。

血清中の 48 種類のサイトカインについて定量測定し、健常ボランティア、無症候感染者、重症患者、超重症患者での比較を行った結果、特に超重症患者で多くのサイトカイン量が上昇している事が示された。超重症患者の経時的な解析では、特に人工呼吸器による処置が行われていた重篤な時期にサイトカイン量が高い傾向があった。またサイトカイン量の上昇はウイルスがPCR で検出されなくなった後でも持続している事が示された。この結果は、超重症患者においてサイトカインストームと呼ばれる免疫の暴走状態が起こっていることを示しており、COVID-19の重症化はウイルスが体内から排除された後にも持続するサイトカイン量の上昇が関わっている事が示唆された。

4．まとめ

COVID-19 患者は無症候感染者から死亡リスクの高い重篤な肺炎を発症する超重症患者まで幅広い症状を呈する。本研究ではその重症化に関わる因子として中和抗体とサイトカインに着目して解析を行った。中和抗体は無症候感染者でも産生されているが、肺炎を伴う重症患者や超重症患者でより多く産生されている傾向があり、また中和抗体の産生に伴ってウイルスが体内から検出されなくなっている事から、中和抗体はウイルスの排除に有効である事が示唆される。一方で、重症者や超重症者の重篤な呼吸器症状はウイルスが排除された後にも持続し、一ヶ月以上入院が必要な患者も複数見られた。超重症患者で見られたサイトカイン量の上昇は、症状の持続と付随するように検出されたことから、重症化にはサイトカインストームと呼ばれる免疫機構の暴走が関与している事が確認された。これらの事から重症化の抑制に関しては、ステロイド療法によるサイトカインの制御が有効であると考えられ、対処法としての提言を行った。

中空磁気蛍光ナノ粒子を用いた新型コロナウイルスの迅速・高精度デュアルモード検出法

研究責任者　静岡大学　グリーン科学技術研究所
グリーンケミストリ研究部門
教　授　　朴　龍洙

１．はじめに

感染症対策において、高感度かつ迅速な病原体診断技術は、適切な予防、治療を実施する上で極めて重要である。これは、今回の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックで再認識された。しかし、グローバル化社会、地球温暖化などを背景に、新興ウイルス感染症の発生は今後も続くものと考えられる。高感度診断としては核酸のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を基盤とした遺伝子検査が主流であり、迅速診断では主にイムノクロマト法による抗原検査が行われている。近年、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法など等温遺伝子増幅法が実用化されているが迅速性は十分とは言えない。これらの問題点を解消し、より高精度に現場でウイルスを検出できる迅速かつ正確な診断技術の開発が必要とされている。

２．内容

本研究では、蛍光を発する量子ドット（QD）を磁気ナノ粒子に包埋し、さらにQDと磁気ナノ粒子の間は中空状態である中空磁気蛍光ナノ粒子（QD-encapsulated magnetic hollow sphere nanoparticle、以下QD@MNS NP）を作製し、QDが磁気ナノ粒子に包埋され、環境の影響を受けにくく、QDの蛍光は安定的に高い強度を保つようにする。また、夾雑物を多く含む検体であっても、磁気により分離されるため、ウイルスの検出による夾雑物の影響は殆どない。夾雑物フリーの標的ウイルスが電極に結合することにより電気化学応答のノイズが少ないため、感度の劇的な低下はなく、複雑な検体からでも高感度ウイルス検出を目指す。さらに、ウイルス検出のエラーを補正し、間違った診断を避けるため、QD@MNS NPの電気化学シグナル（図１c）と蛍光（図１d）を測定することでデュアルモードウイルス検出方法[1)]を確立する。

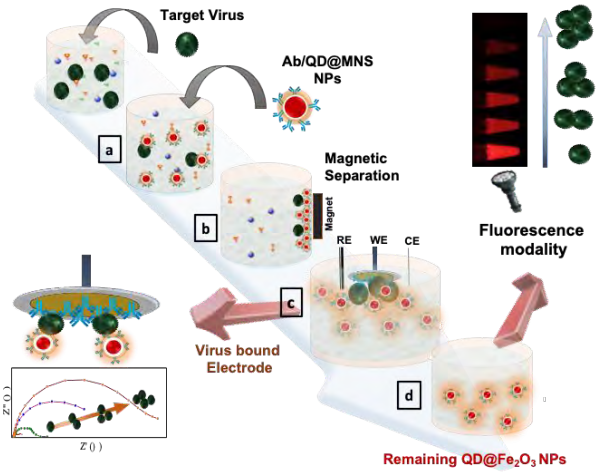


図１．中空磁気蛍光ナノ粒子によるウイルスのデュアルモダリティ検出の概要図。（a）標的ウイルスとQD@MNS NPとの結合、（b）ウイルスの磁気分離、（c）磁気分離サンプルの電気化学的測定、（d）磁気分離後上澄みの蛍光測定。

3. 成果

3．1 QD@MHS NPs の合成と物理学的解析

QD@MHS NPs は、QD の合成、Fe シェルの合成および QD と磁気ナノ粒子の間を中空にするための鉄の酸化の手順で作製した（図 2a)。合成した QD は 6〜14 nm の球状（図 2b）で平均粒径は 10 nm であった（図 2c)。一方、鉄イオンは QD の表面に堆積し $Fe(CO)_5$ を形成し(図 2d）粒径 15 nm のコア／シェル構造を形成した（図 2e)。O_2/Ar の混合気体中で、Fe は酸化が進み、QD と Fe シェルの間は空洞を形成 [2]し、粒径 20 nm の QD@MHS NPs を得た(図 2f–g)。

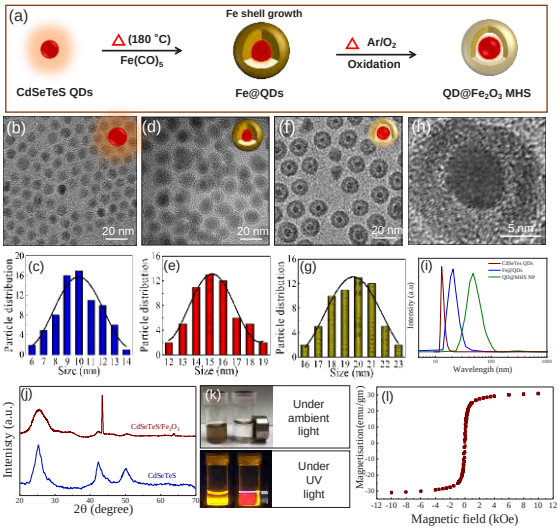


図２．QD@MHS NP の物理的特性。

（a) QD@MHS NP を生成する合成ステップ。QD (b)、Fe@QD（金属鉄シェル）(d) および QD@MHS NP (f) の TEM 画像。

QD (c)、Fe@QD (e) および QD@MHS NP (g) の粒子サイズ分布。QD@MHS NP の高解像度 TEM (HRTEM) 画像 (h) 及び DLS 測定 (i)、XRD パターン (j)。QD@MHS NP の磁気分離と蛍光 (k)。QD@MHS NP の 300 K での飽和磁化 (l)。

コアとシェルの間の空洞は、高解像度 TEM で明らかになった(図 2h)。得られた各粒子を DLS で粒径分布を調べた結果、QD、Fe@QD 及び QD@MHS NPs はそれぞれ 20、25 および 50 nm であった(図 2i)。QD の回折パターンは、(111)、（220）および（311）結晶面に対して 2θ が 24.7°、42.4° および 50.4° の 3 つの特徴的なピークを示し結晶性および立方体である [3]ことを示した（図 2j)。また得られた QD@MHS NPs は、磁石で容易に分離ができ、蛍光を発し（図 2k)、飽和磁化は 31.6 emu/g（図 2l）であった。

3．2 作製した QD@MHS NPs の化学的解析

XPS 分析では Se 3d（52.9 eV)、S 2p（163.3 eV)、C 1s（284.7 eV)、Cd 3d（405.7 eV)、O 1s（532.1 eV)、Te 3d (582.9 eV) および Fe 2p (711.5 および 725.1 eV) に特徴的なピークを示した(図 3a)。QD および QD@MHS NP の Cd スペクトルでは、QD の表面に中空の酸化鉄が形成された後でも、Cd 3d の位相はあまり影響を受けないことを示した（図 3b)。また、Fe $2p_{3/2}$ と Fe $2p_{1/2}$ の特徴的なピークはそれぞれ 710.9 eV と 724.8 eV に集中しており、複合材料での Fe_2O_3 の形成を確認でき、Fe_2O_3 と Fe_3O_4 の共存の可能性を示す [4] (図 3c)。QD@MHS NP の UV/Vis スペクトルでは、中空鉄シェルの成長後でも QD の特徴的な吸収ピークを示し（図 3d)、ピークの幅が少し広がった（図 3e)。QD@MHS NP の量子収率はウイルス検出用の蛍光検出プローブとして十分な 17%であった [5]。

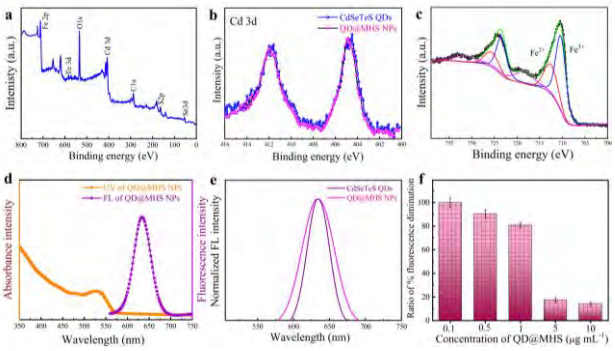


図 3. QD@MHS NP の化学的特性。(a) 合成された QD@MHS NP の XPS スペクトル、(b) QD および QD@MHS NP の Cd 3d スペクトル、(c) Fe 2p の XPS スペクトル、(d) QD@MHS NP の吸収および蛍光スペクトル、(e) QD および QD@MHS NP の蛍光スペクトル、(f) 1 ng/mL HEV 様粒子（HEV-LP）の存在下での蛍光強度に対する QD@MHS NP 濃度の影響。

検出パラメーターの最適化を行うために、抗HEV 抗体標識 QD@MHS NP（0.1、0.5、1、5、および 10 μg/mL）を使用した。5 および 10 μg/mL の QD@MHS NP では、HEV-LP の量に比べ過剰に存在するため、蛍光減少率は非常に低く（図 3f）、最低濃度の 0.1 μg/mL では電極に結合したため、ほぼ 100%の蛍光が減少した。最終的に 1μg/mL の QD@MHS NP の条件でウイルス検出を行った。

3．3 E 型肝炎ウイルス（HEV）のデュアルモダリティ検出

異なる濃度の E 型肝炎ウイルス様粒子（HEV-LP）を抗 HEV 抗体修飾 QD@MHS NP と混合し、Au||rGO/anti-HEV 抗体修飾電極の電気化学インピーダンス分光法（EIS）応答の変化[6]を示す（図 4a）。電極電解質界面（Rct）での電荷移動抵抗を表すナイキストプロットの半円の直径は、HEV-LP の濃度依存的に大きくなり、10 fg/mL から 10 ng/mL の範囲の HEV-LP 濃度の間に良好な直線関係を示した（図 4b）。3σ/S（σ は最低信号の 10 回分の標準偏差、S は線形検量線の勾配）定義による検出限界（LOD）は 1.2 fg/mL であった。また、磁気分離後の上澄みの蛍光スペクトルは図 4c のようであった。HEV-LP の濃度が 10 fg/mL から 10 ng/mL に増加するにつれて、630 nm での蛍光スペクトルの検量線を図 4b に示す。LOD は、3σ/S の定義[5]により、2.6 fg/mL であった。

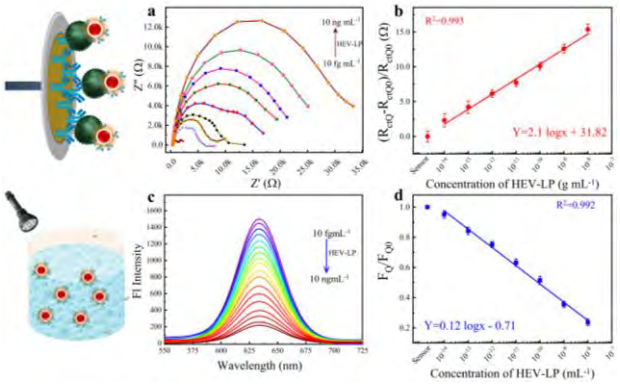


図 4. HEV-LP のデュアルモダリティ検出。（a、b）電気化学インピーダンス分光法による HEV-LP の検出及び検量線、（c、 d）蛍光による HEV-LP の検出及び検量線。

3．4 E ノロウイルス（NoV）のデュアルモダリティ検出

デュアルモダリティ検出を再確認するためにノロウイルス様粒子（NoV-LP）および臨床ノロウイルス（NoV）の検出を行った。NoV-LP の濃度 10 fg/mL から 10 ng/mL に対するナイキストプロット（図 5a）、蛍光スペクトル（図 5b）及び検量線（図 5c）を示す。両方とも相関係数 0.99 を示した。同様に人間の糞便から得られた臨床サンプルを検体とした場合、10^2 から 10^7 の RNA コピー/mL の範囲でデュアルモダリティ検出が可能で（図 5d、e）、電気化学インピーダンスおよび蛍光法で相関係数がそれぞれ 0.987 および 0.986、LOD は 69 RNA コピー/mL と測定された（図 5f）。

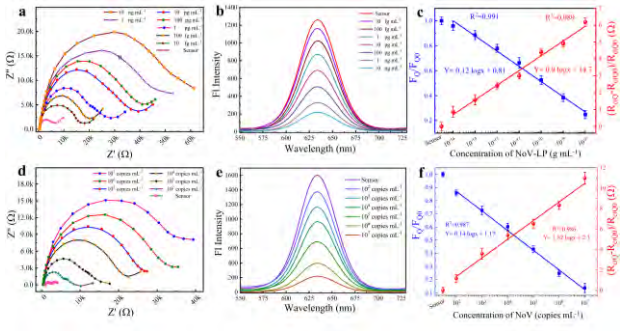


図 5. NoV-LP（a～c）および臨床検体からの NoV（d～f）のデュアルモダリティ検出。（a、d）異なる濃度の EIS スペクトル、（b、e）蛍光曲線、（c、f）デュアルモダリティ検量線。

3．5 HEV のデュアルモダリティ検出及び安定性

細胞培養上清からの HEV を回収してデュアルモダリティ検出を行った。EIS 測定では、HEV の濃度が 10^2～10^7 RNA コピー/mL から増加するにつれて継続的に増加し、蛍光シグナルの強度は減少した（図 6a）。HEV の検出は、電気化学モダリティで 0.988、蛍光モダリティで 0.987 の相関係数を示した。HEV の LOD は 57 RNA コピー/mL と測定された。

この成果を検証するために、HEV 感染カニクイザルの糞便検体[7]から HEV のデュアルモダリティ検出を行った。

感染のピークは、1～2 週間以内に示され、徐々

に検出不能な量まで減少した（図 6b）。さらに、デュアルモダリティ検出結果、インピーダンスと蛍光強度の時系列変化はRT-qPCRデータとほぼ重なり、RT-qPCR の感度と比べ遜色のない結果であった（図 6b）。この結果は、実際のサンプルに対する適用性を示すものであった。

標的ウイルスとの選択性を調べるために、抗 HEV 抗体を修飾した電極と QD@MHS NP を用いてインフルエンザウイルス、NoV、ホワイトスポットシンドロームウイルス（WSSV）およびジカウイルスの検出を行った結果、HEV-LP のみ検出シグナルを得ることができ（図 6c）、デュアルモダリティ検出の優れた特異性を示した。また、夾雑物として血清を含んだ場合の蛍光を調べた結果、QD@MHS NP は干渉サンプルとは結合できないため、蛍光強度は HEV-LP の存在下でのみ減少した（図 6d）。

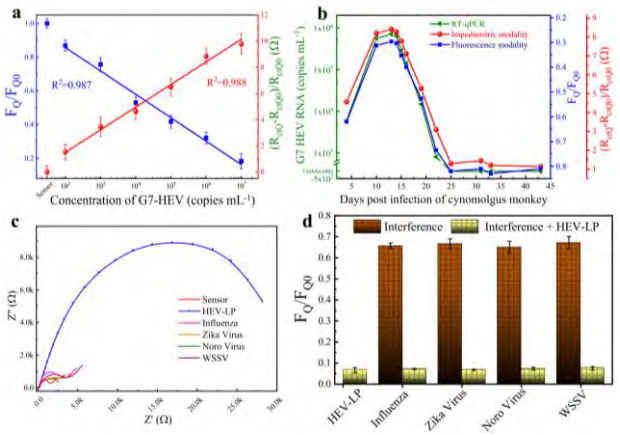


図 6.（a）細胞培養上清中の HEV のデュアルモダリティ検出。(b) カニクイザルの糞便サンプル中の HEV のデュアルモダリティと RT-qPCR による検出の経時変化、(c) 電極の選択性、（d）夾雑物による電極の安定性。

４．まとめ

QD@MHS NP を作製し、電気化学的応答および蛍光によるデュアルモダリティ検出法を確立した。QD@MHS NP は、内包した QD の蛍光を保持し、中空球からの磁気特性も提供する。QD@MHS NP の強力な磁気により、前処理なしで夾雑物を含むサンプルから効率的に標的ウイルスを分離した。その結果、標的ウイルスが存在すると作用電極から増幅された電気化学的シグナルと、測定系の上清からの蛍光シグナルを得ることができた。HEV-LP は、1.2 fg/mL までの検出限界を備えたデュアルモダリティ検出が可能であった。本研究で開発されたウイルス検出系は、観察可能な干渉を誘発することなく、複雑な臨床サンプル診断に優れた性能を示している。さらに、HEV に感染したサルからの糞便サンプルの検出にうまく適用され、RT-qPCR から得られたデータと同様の感度が見られた。QD@MHS NP に修飾する抗体を変更するだけで標的ウイルスを検出できる。本研究ではコロナウイルスのサンプルの入手が困難で、当初目標としていたコロナウイルスの検出ができなかったが、HEV や NoV の検出例から、コロナウイルスも十分検出可能であると考えている。

謝辞

臨床 NoV と HEV はそれぞれ静岡県環境衛生科学研究所 阿部冬樹様と国立感染症研究所 李天成博士にご提供頂きました。また、ジカウイルスおよび WSSV は、それぞれ長崎大学熱帯医学研究所 森田公一教授、水産研究・教育機構 増養殖研究所 佐藤純博士から分譲頂きました。本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の助成によるものであり、御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1) Xiong et al., 2018. ACS Nano 12(9). 9549–9557.
2) Yin et al., 2004. Science 304(5671), 711–714.
3) Adegoke et al., 2015. J. Alloys Compd. 645,443–449.
4) Lv et al., 2015. J. Mol. Catal. Chem. 400, 81–89.
5) Ganganboina and Doong, 2018. Microchim. Acta 185(11), 526.
6) Chowdhury et al., 2019. Nat. Commun. 10, 3737.
7) Li et al., 2016. J. Hepatol. 65(6), 1104–1111.

含窒素有機化合物の分子モデリング法を用いた抗 COVID19 活性の評価

研究責任者　福山大学　薬学部
活性分子物理化学研究室
講　師　　前原　昭次

１．はじめに

2019 年末から SARS-CoV-2 を原因ウイルスとする感染症（COVID-19）は、現在も世界規模の感染拡大を続けている。COVID-19 の蔓延により、重症患者や死者の増加、医療体制の逼迫、感染後後遺症等様々な問題が世界中で引き起こされている。本感染症に対するmRNA ワクチンが開発され、日本においても投与計画が進められているが、その効果を確認できるのはまだ先である。これまで日本において重症者の治療薬には、レムデシビルやデキサメタゾンが、軽症者の治療薬として抗体カクテル療法の（商品名：ロナプリーブ）が承認され使用が開始された。しかし、現在までに無症状者のための治療薬はない。さらに、世界各地で原因ウイルス SARS-CoV-2 のスパイク遺伝子変異が起き、スパイクを標的とする現行ワクチンに耐性を獲得する可能性が常に危惧され、感染者の上昇による医療の逼迫が加速する可能性がある。これらのことから、COVID-19 に対する有効な予防法や治療薬の開発が急務かつ重要な課題である。

2019 年の発生以降、世界中で蔓延している COVID-19 から、2002 年に発生した SARS（重症呼吸器症候群）に至るまでの研究論文からコロナウイルスに特有の 3CL プロテアーゼ阻害活性を有する含窒素有機化合物に関する情報を抽出した。そのうち ebselen と tideglusib[1]（図１）に着目し、これまで有機合成によって我々が得た化合物の中から、いくつかの類似化合物を選択した。これらの類似化合物の 3CL プロテアーゼ阻害活性と分子モデリング法を用いたシミュレーションによる活性予測に関する研究を行った。

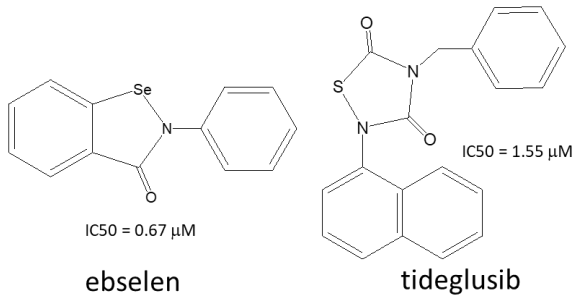


図１．ebselen と tideglusib の化学構造と３CL プロテアーゼ阻害活性（*Nature*, 07, Apr, 2020）

２．内容と成果

我々がこれまでに有機合成で得た化合物と COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 の３CL プロテアーゼに対する阻害活性を有する ebselen、tideglusib 及び PX-12 と SARS 原因ウイルスである SARS-CoV の３CL プロテアーゼ阻害活性を有する 45240[2] の化学構造類似性を MACCS Key で比較した。類似度のスコア（Tanimoto 係数）が 0.6 以上の化合物（表１）に焦点を当てた。

表１．候補化合物の化学構造と MACCS Keys における Tanimoto 係数

	ebselen	tideglusib	PX-12	45240
	IC50＝0.67 μM	IC50＝1.55 μM	IC50＝21.39μM	IC50＝2.5 μM
候補化合物-1	0.74			
候補化合物-2		0.41	0.26	0.64
候補化合物-3		0.24	0.09	0.24

候補化合物について、BPS Bioscience 社の３CL プロテアーゼアッセイキットを用いて活性試験を行い、阻害曲線をプロットした。求めた阻害曲線から IC50 を算出した。

これらの候補化合物-1[3]，-2 及び-3[4]の３CL プロテアーゼ阻害活性はいずれも低い値（IC50 ＞500）であった。（図２）この結果から、今回の試行においては MACCS Keys の類似度と SARS-CoV-2 の３CL プロテアーゼ阻害活性の相関性は見られなかった。

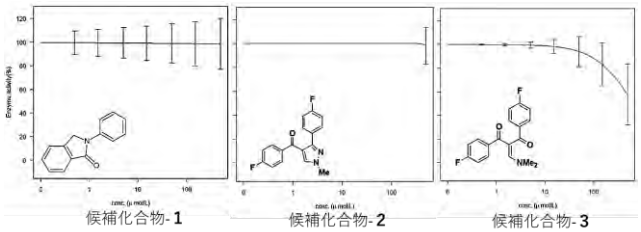


図２．候補化合物-1，-2，-3 の３CL プロテアーゼ阻害活性（n=2）

そこで、より類似度の高かった候補化合物-1 に着目し、ebselen のセレン原子を酸素、硫黄に置き換えた化合物及びフェニル基を水素に置き換えた化合物の３CL プロテアーゼ阻害活性を測定した。

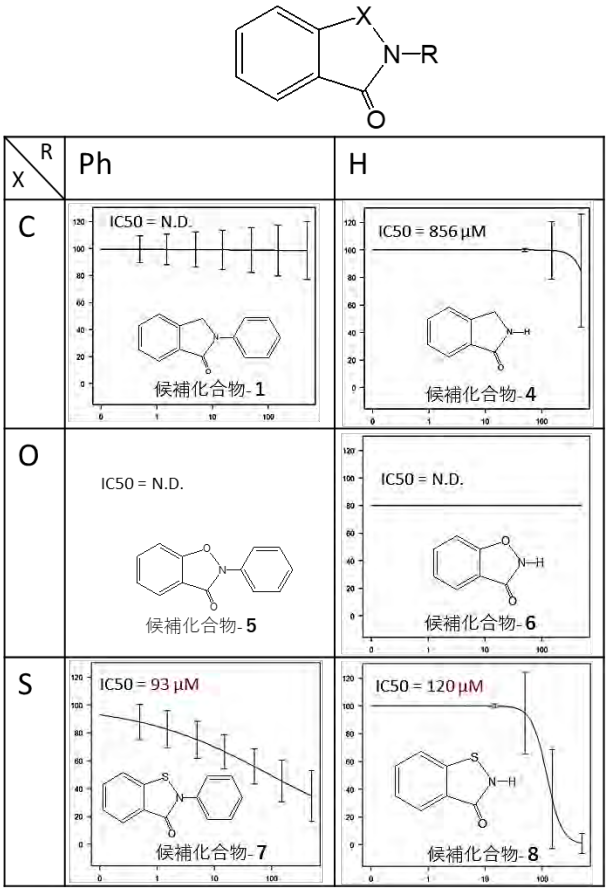


図３．Ebselen 誘導体の３CL プロテアーゼ阻害活性（n=2）

そこで、X の元素が S で、R がベンゼン環である化合物が最も３CL プロテアーゼ阻害活性が高いことが明らかになった。Ebselen の活性発現には、五員環が開裂し、Se 原子がシステインの S 原子と付加反応することで起こるとされている。[5] これは、ebselen を阻害剤とした３CL プロテアーゼ結晶解析構造から明らかにされている[1]。上記の活性試験で最も活性の強かった候補化合物-７の五員環を開裂させた化合物（候補化合物-９）の３CL プロテアーゼ阻害活性を測定した。

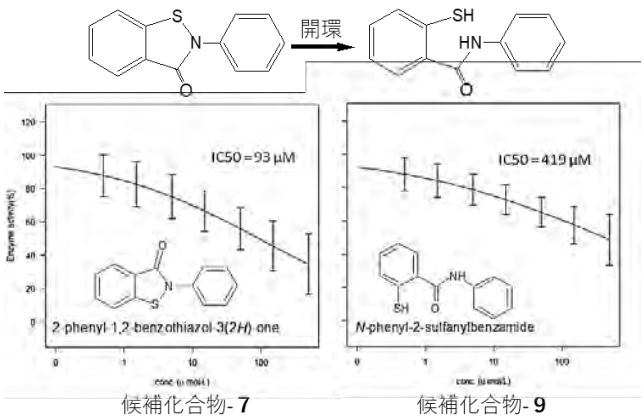


図４. 候補化合物－７ ,－９の３CL プロテアーゼ阻害活性（n=3）

興味深いことに、閉環したままの候補化合物-7（IC50= 93 μM）の方が開環した候補化合物-9（IC50= 419 μM）よりも高い阻害活性を示した。（図４）

以上のことから閉環したままの化合物が、システインの S 原子の攻撃を受けて開環と S の付加が同時に起こる Michel 反応が起こっているのではないかと考えられた。（図５）

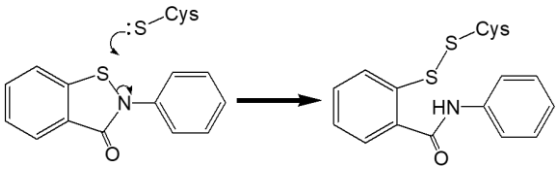


図５. 推測される五員環開環反応

そこで、システインの S 原子を標的とした開環反応の分子モデリングを用いたシミュレーションを行い、活性化エネルギーの予測値の算出を行った。本開環反応の進み易さが３CL プロテアーゼ阻害活性の強さであると考えた。

先ず、ebselen をもとに反応シミュレーションを行った。ωb97xd/6-31+g(d)の密度汎関数法でモデリング後、AFIR 法で解析した結果、反応候補として Reaction candidate-1 と Reaction candidate-2 の 2 経路を見出すことができた。（図６）

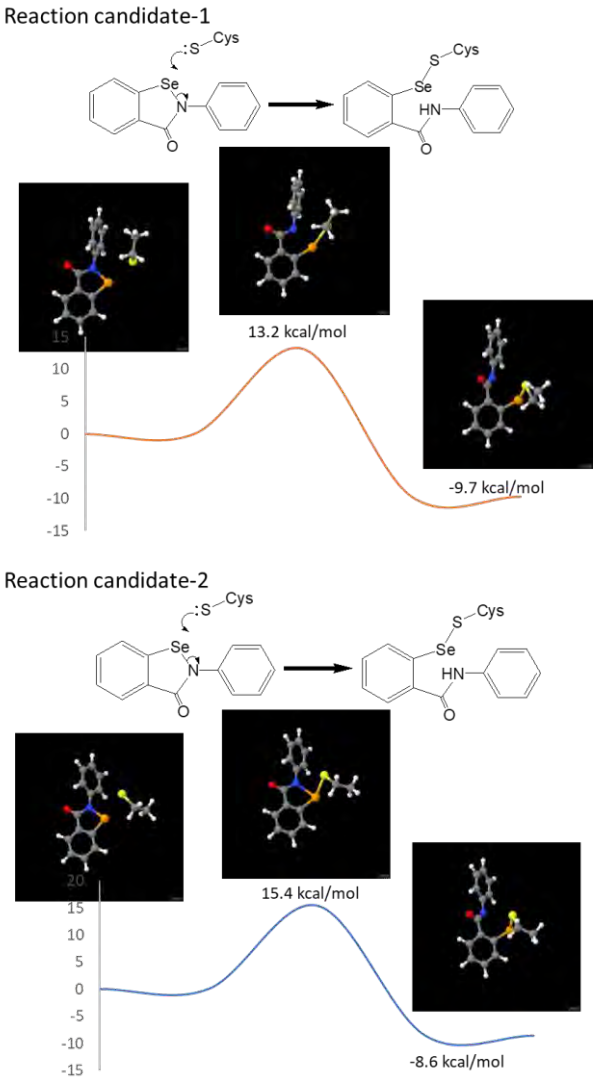


図６. 分子モデリングを用いた反応シミュレーション：wb97xd/6-31+g(d)の密度汎関数法でモデリング後、AFIR 法で解析し得られた反応候補 Reaction candidate-1 と Reaction candidate-2

得られた二つの反応は、システインの S 原子が Se 原子に付加する際の向きが異なり、Reaction candidate-1 では手前側からの付加反応、Reaction candidate-2 では奥側からの付加反応であった。Reaction candidate-1 の生成化合物のエネルギーが-9.7 kcal/mol と reaction candidate-2 の-8.6 kcal/mol よりも低いことから、Reaction candidate-1 の方が起こり易い反応経路であると考えられた。

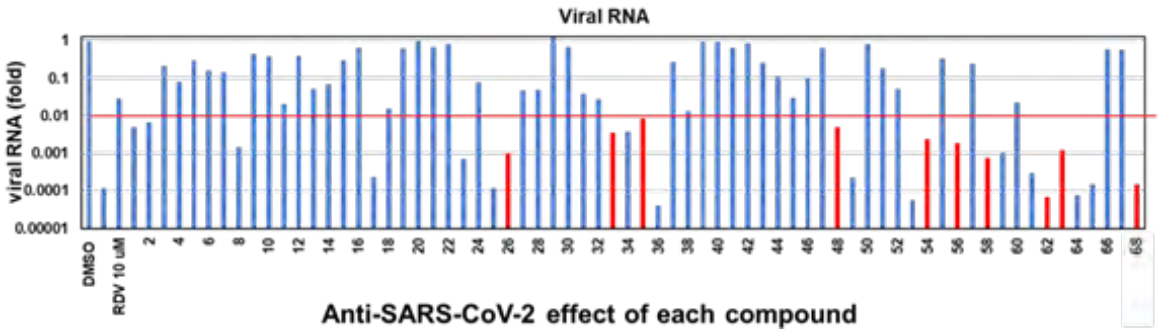


図７．抗 SARS-CoV-2 活性スクリーニング

同様に、S-O、O-O についても反応シミュレーションを行い、活性化自由エネルギーを算出した。

その結果、Se 原子を有する ebselen が最も活性化エネルギーが低く 13.2 kcal/mol、S 原子を有する候補化合物-７は活性化エネルギーが 24.3 kcal/mol であると算出され、C 原子を有する候補化合物-１は反応が進行しないと推測された。（表２）

表2. 五員環開環反応のシミュレーションにおける活性化自由エネルギーと3CL プロテアーゼ阻害活性の相関性

Type	Activate ΔG (kcal/mol)	3CL Protease Inhibition IC_{50} (μM)
Se-S	13.2	0.67
Se-S	15.4	
S-S	24.3	93.0
C-S	Not proceed	Not detected

これらの結果は、３CL プロテアーゼ阻害活性と相関性が見られることから。五員環の開裂反応のシミュレーションにおける活性化エネルギーの値は ebselen 類似化合物について活性推測に利用できることが示唆された。

含窒素有機化合物とは異なるアプローチからも抗 SARS-CoV-2 活性を有する化合物の探索を行った。我々はこれまでに、日本と東南アジア諸国による科学技術の発展促進を目的としたプラットホーム拠点事業（JASTIP）の一環でインドネシアと日本の各国の研究者が自国においてアカネ科植物、ヨモギ、チョウセンアサガオ等薬用植物の採集及び共生する植物内生菌の多様性を調べるために分離・同定を行ってきた。得られた植物内生菌の抽出エキス及び分離化合物の抗 SARS-CoV2 活性スクリーニングによって、68 種の検体のうち 10 種の検体が候補サンプルとして見出された。（図 7）そのうちのひとつは、*Bipolaris* 属の真菌が産生するテルペノイド ophiobolin A であった。本化合物は、チョウセンアサガオ *Datura metel* の茎および葉から分離された植物内生菌 *Bipolaris* sp.が産生する化合物で、培養液中から高収率で得ることができる[6)]。我々はこの ophiobolin A の SARS-CoV-2 に対する活性のメカニズムを明らかにするために。３CL プロテアーゼ阻害活性の測定を行った。その結果、32 μM の IC50 阻害活性を示した。（図８）

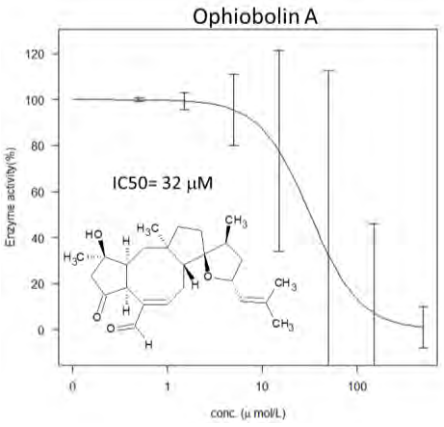


図８．Ophiobolin A の３CL プロテアーゼ阻害活性

以上のことから、ophobolin A が３CL プロテ

アーゼ阻害活性を有することが明らかになった。

SARS-CoV-2の３CLプロテアーゼの立体構造を分子モデリングで作成し、AutodockVinaを用いて、ophobolin Aとの複合体構造を予測した。その結果、ophiobolin A分子は活性部位であるアミノ酸残基Cys141に近いサイトで複合体を形成し、３CLプロテアーゼのポケットに入ることが明らかになった。この事により分子モデリングを用いたドッキングシミュレーションによっても３CLプロテアーゼとの関与が示唆された。(図９)

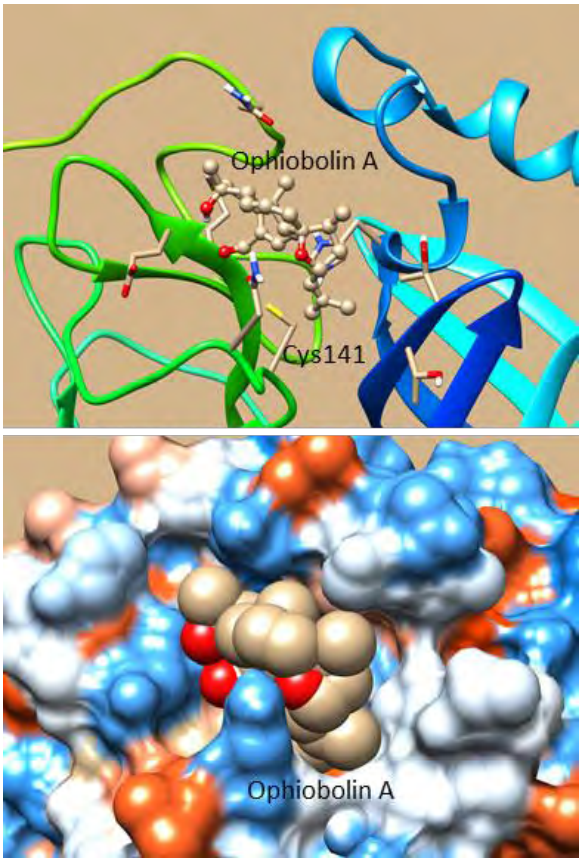


図９．Ophiobolin AとSARS-CoV-2の３CLプロテアーゼの分子モデリングによる複合体構造

Ophiobolin Aは抗がん活性も有する[7]ことから、今後、抗がん活性を有する有機化合物に着目し、新たな候補化合物リストを作成し、抗SARS-CoV-2活性を有する有機化合物の探索並びに分子モデリングを用いた活性推測ツールの評価と改良を行っていく計画である。

３．まとめ

MACCS Keysにおける類似度を基に３CLプロテアーゼ阻害活性の測定を行ったが、強い相関性は認められなかった。また、ebselen及びその類似化合物の３CLプロテアーゼ阻害活性は五員環のSe原子によるものであった。Se原子をC原子やO原子に置き換えたとき活性を示さなかったがS原子に置き換えたとき活性を示した。これらの活性の発現は、開環状態での反応ではなく、五員環の開裂によるS原子の付加によるものであることが明らかになった。五員環の開裂反応のシミュレーションを行い、活性化エネルギーを求めることでebselenとその類似化合物のSARS-CoV-2の３CLプロテアーゼ阻害活性のとの間に相関性があることが明らかになった。その結果、本研究によってこれまでとは異なるアプローチによる活性予測ツールを見出すことができた。

さらに、新たな研究資源として真菌が産生する抗腫瘍成分ophiobolin Aに３CLプロテアーゼ阻害活性を見出すことができたことから、今後、植物内生菌が産生する二次代謝産物の利用した抗SARS-CoV-2活性物質の探索や今回見い出したophiobolin Aに類似した抗がん活性を有する有機化合物のSARS-CoV-2の３CLプロテアーゼ阻害活を明らかにすることによって、将来的に新たな知見を見出すことの可能性を導き出した。

研究分担者

本研究における有機化合物の合成は、福山大学薬学部医薬品化学研究室の町支臣成教授、西山卓志講師、臨床分析化学研究室の井上裕文教授が担当した。また、３CLプロテアーゼ阻害活性測定と分子モデリングを用いたシミュレーションは、福山大学薬学部活性分子物理化学研究室の前原昭次講師と秦季之教授が担当した。

謝辞

３CLプロテアーゼ阻害活性の測定を行うにあたり、アドバイスをいただきました福山大学

薬学部の中村徹也助教に感謝申し上げます。また、有機合成反応を行っていただいた福山大学共同利用センター稗田雄三講師に感謝申し上げます。

参考文献

1) Zhenming Jin, Xiaoyu Du, Yechun Xu, Yongqiang Deng, Meiqin Liu, Yao Zhao, Bing Zhang, Xiaofeng Li, Leike Zhang, Chao Peng, Yinkai Duan, Jing Yu, Lin Wang, Kailin Yang, Fengjiang Liu, Rendi Jiang, Xinglou Yang, Tian You, Xiaoce Liu, Xiuna Yang, Fang Bai, Hong Liu, Xiang Liu, Luke W. Guddat, Wenqing Xu, Gengfu Xiao, Chengfeng Qin, Zhengli Shi, Hualiang Jiang, Zihe Rao & Haitao Yang, Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors, *Nature*, **582**, 289–293 (2020).
2) Chih-Jung Kuo, Hun-Ge Liu, Yueh-Kuei Lo, Churl-Min Seong, Kee-In Lee, Young-Sik Jung, Po-Huang Liang, Individual and common inhibitors of coronavirus and picornavirus main proteases, FEBS Letters, **583**, 549-555 (2009).
3) Yasuto Tsuruta, Hirohumi Inoue, 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxy-phenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent for determination of amino acids in high-performance liquid chromatography and its application for determination of urinary free hydroxyproline, *Analytical Biochemistry*, **265** (1):15-21 (1998).
4) Rika Kotouge, Takashi Nishiyama, Akira Yamauchi, Kanako Ono, Noriyuki Hatae, Tsutomu Oikawa, Satoshi Hibino, Tominari Choshi, Synthesis of 4-aroyl-5-arylpyrazoles and 4-aroyl-3-arylpyrazoles via the reaction of enaminodiketones with substituted hydrazines, *Heterocycles*, **100**, 25-45 (2020).
5) Kangsa Amporndanai, Xiaoli Meng, Weijuan Shang, Zhenmig Jin, Michael Rogers, Yao Zhao, Zihe Rao, Zhi-Jie Liu, Haitao Yang, Leike Zhang, Paul M. O'Neill & S. Samar Hasnain, Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives, *Nature communication*, 2021 May 24;12(1):3061. Doi: 10.1038/s41467-021-23313-7.
6) Shoji Maehara, Chihiro Yamane, Chinami Kitamura, Minako Hinokuma,Toshiyuki Hata, High ophiobolin A production in endophytic fungus *Bipolaris* sp. associated with *Datura metel, Nat. Prod. Res.*, **34**(20), 2990-2992 (2020).
7) In Young Kim, MiRi Kwon, Min-Koo Choi, Dongjoo Lee, Dong Min Lee, Min Ji Seo, and Kyeong Sook ChoiOphiobolin A kills human glioblastoma cells by inducing endoplasmic reticulum stress via disruption of thiol proteostasis, *Oncotarget*, **8**, (63), 106740-106752 (2017).

発表

・日本薬学会　第 141 年会（広島）【27P01-110：*N*-phenylphtalimidine 類の SARS-CoV-2 main protease 阻害活性】2021 年 3 月 27 日

コロナ重症者へのペリスタ式 ECMO 治療の効率化～有棘赤血球による圧閉度の最適化

研究責任者　公立大学法人前橋工科大学
システム生体工学科
教　授　　野村　保友

１．はじめに

2020 年は新型コロナウイルスの流行が社会に大きな影響を与えた。特に 4 月 7 日には東京、大阪、福岡などに対して史上初の緊急事態宣言がなされて、16 日にはそれが全国に拡大された。ヒト同士の接触の機会が激減し緊張感が高まった。その頃、この感染症の治療では重症化した患者に対して限られた台数の体外式膜型人工肺 Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) が効果的に使われた。5 月 25 日までに緊急事態宣言は全国で解除された。その間が第一波と認識され、夏の第二波、秋からの第三波と続いた。

12 月に入って欧米でワクチン接種が開始されたが、その効果の持続性など楽観視できない点も多く、長期にわたってこのウイルスと共存することを考える必要がありそうである。そのためにはこれまで以上に機器や操作者の充実は避けられない。しかしながらコロナ患者を受け入れた病院ほど経営的に甚大な悪影響が出てしまい、実際にはその充実はあまり進んでいない。政府により病院への財政支援が進められているが、一方で重症コロナ患者に対する医療コストを抑制する方策を医療機器の側面からも検討する必要があると考えた[1]。

２．課題

呼吸をサポートする ECMO（veno-venous ECMO, V-V ECMO）は患者から静脈血を取りだし人工肺で酸素化し二酸化炭素を除去した血液を静脈へ戻す。循環をサポートする ECMO（veno-arterial ECMO, V-A ECMO）とは異なる部分が多く、重症コロナ患者では V-V ECMO に特徴的な長期管理が数か月に及ぶ場合もあり、血栓を回避するための交換が必要になる。V-V ECMO を交換する際、チューブやガス交換膜などの消耗品に比べて血液ポンプは高価である。

体外循環ポンプは多くの場合、遠心ポンプあるいはペリスタポンプが使われる。遠心ポンプは 5 L/min 程度で安定した送血機能が重要な特徴の一つであるが、血液と直接接するため高価な遠心ポンプ自身を交換しなければならない。一方、ペリスタポンプではポンプ部分が血液に直接触れないためチューブのみの交換が可能であることが大きな長所である。これまで体外循環開始時に最適な圧閉度を設定してきたが、長期管理では送液チューブの圧閉度を絶えず最適化しなければ赤血球の劣化や溶血は避けられない。

３．成果

生体内では正常な赤血球はずり応力が大きい時に赤血球が変形して粘性が低下する。赤血球が硬く変形できないときには粘性が増す。この粘性の増加に続いてポアズイユの法則にしたがい、血圧が上昇したり血流量が低下することに

なる。このようにずり応力は血流や血液細胞へ与える影響は大きい。体外循環時に赤血球が可逆的な形態変化から不可逆的な状態へ進むと最終的には溶血に至り、ガス交換機能が低下する。したがって溶血が起こる前の前兆を把握できれば不適切な圧閉度を調節することによって赤血球機能低下の進行を抑制できるかもしれない。ずり応力はずり速度と粘性に比例するので、粘性を一定に保つ条件下でのずり速度に対する赤血球形態変化を赤血球の吸収・散乱スペクトルを測定できる実験系を組み立てている。図１の

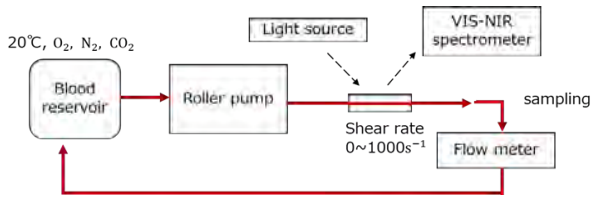


図１．ずり応力負荷可能な血液循環システム

ブロックダイヤグラムで示すように血液貯蔵槽で温度と酸素飽和度を調整し粘性を維持する。ローラーポンプで送血し、その先でずり速度を設定するために流路断面 5 mm×5 mm のフローセルを接続する。これにより流量に依存してずり速度を 0~1000 s^{-1} に調整可能である。このフローセルに光ファイバーを介してハロゲン・タングステンランプからの可視近赤外光を照射する。拡散反射光と拡散透過光のスペクトルを分光光度計で測定可能である。流量はカルマン渦式フローメータで計測する。その後で血液を貯蔵槽へ戻す。この血液貯蔵槽で pH を測定する一方、血液を採取して蛍光ラベルされた赤血球の蛍光顕微鏡観察できるようにした。固定後に電子顕微鏡観察により微細構造を確認する。実際の循環システムを図２に示す。現在、光学系の組み込み作業中である。

上記のシステムを利用して、ずり応力が赤血球へ与える影響を分光データにもとづいて検討したい。解析の切り口としては赤血球の老化に注目している。溶血のしやすさ、赤血球変形能の低下、凝集のしやすさなど類似性からずり応力

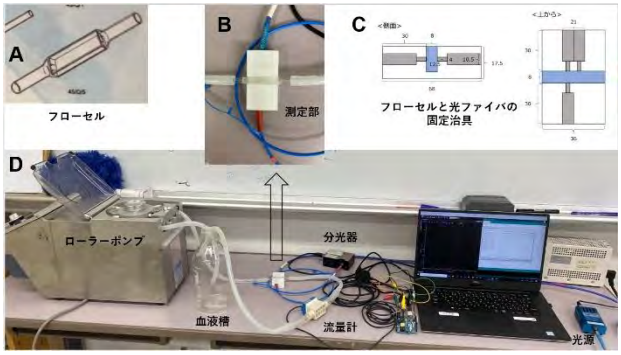


図２．実際の血液循環システム。A:フローセル、B:測定部、C: フローセルと光ファイバーの固定治具（3D プリンタ出力）、D:可視近赤外スペクトル測定可能な血液循環システム

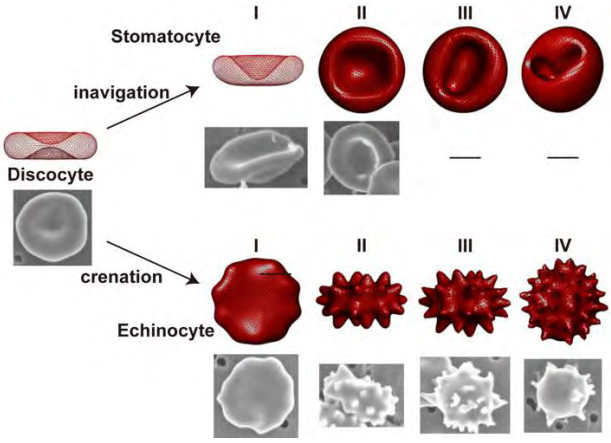


図３．老化赤血球で観察される口状ー円盤状ーいが状赤血球変形。赤は数値解析結果で、モノクロ写真は電子顕微鏡像

による赤血球の変化が赤血球の老化と同じ機序を共有しているとの指摘がある。図３に示すようにパイロット実験で得た固定老化赤血球の電子顕微鏡画像と数値解析結果の対応については一部明らかになった[2-3]。

赤血球の老化により硬くなった赤血球が脾臓の中をゆっくり移動することによって、IgG のようなオプソニンがマクロファージによる認識をしやすくなり、食作用が促進されると指摘された[4]。老化した赤血球では赤血球膜の内面にメトヘモグロビンが結合することで細胞膜を貫通したタンパク Band 3（陰イオン交換体）の凝

集を促進する。さらにその後に起こる Band 3 クラスタへの IgG の結合が脾臓での老化赤血球除去を促進する。Band 3 タンパクがもつ老化抗原について IgG の抗原決定基を含むことが明らかにされた[5]。この老化抗原は若い赤血球の Band

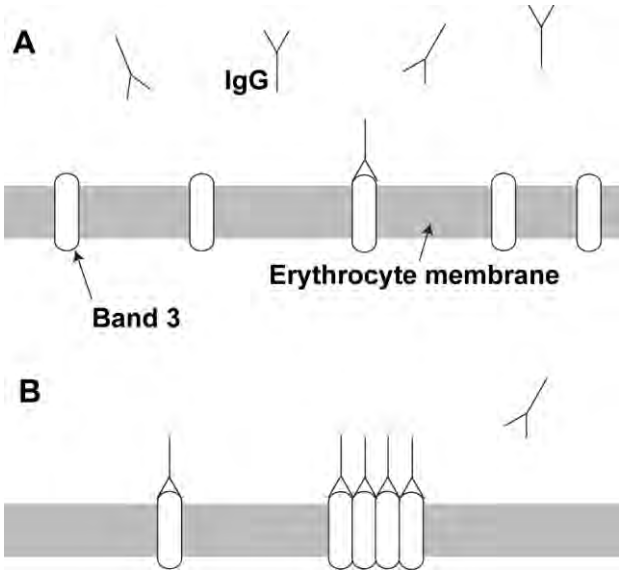


図 4. 赤血球膜におけるバンド３クラスタリングモデル　A: 正常時、B: 老化赤血球。

3 にもあるので、老化の過程の重要なステップは IgG の老化抗原への結合効率の増加だろうと考えられている。そのステップは凝集、酵素による修飾、あるいは分子の再配列によって起きるのかもしれない。若い赤血球は血流の間に何度も生じる変形で抗原決定基がだんだん露出するようになっていくということは十分に考えられる。ずり応力の結果として生じた膜タンパクの構造変化が老化抗原を露出させるかもしれない。さらにずり応力が負荷されることによって細胞膜流動性が促進されて、Band 3 クラスタリングや立体構造の変化を促す可能性もある。

さらに細胞膜リン脂質スクランブルによるホスファチジルセリンの細胞外表面への露出と細胞形態変化を特徴とするアポトーシス仮説 Eryptosis も提案された[6]。これは本来細胞外に存在しないホスファチジルセリンが細胞外へ現れることから蛍光顕微鏡の高感度観察で確認できることが期待される。

５．まとめ

ペリスタポンプの圧閉度を最適化するために、赤血球の劣化を早期に検出する指標を設定する必要がある。そこで本研究では任意のずり応力を負荷できる血液循環システムを構築した。今後はこれを用いて拡散透過光スペクトル、拡散反射光スペクトル、蛍光画像、電子顕微鏡像などから最適圧閉度を設定するために適した指標を検討したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究者の群馬パース大保健科学部臨床工学科（現：群馬医療福祉大医療技術部臨床工学専攻講師）の加藤正太先生には体外循環装置の理論と実機の提供を受け、有益な討論を行いました。また血液の固定および電子顕微鏡観察では明治薬科大学薬学教育研究センター教授、中舘和彦先生にご協力いただきました。本研究は公益財団法人中谷医工計測技術振興財団新型コロナウィルス感染症対策助成プログラムの支援を受けて実施されました。ここに深く感謝申し上げます。

参考文献および発表論文

1) 柴田理沙、加藤正太、中舘和彦、野村保友. ペリスタ型血液ポンプが赤血球に及ぼす影響～ずり応力効果の分光学的評価. 前橋工科大学研究紀要 24, 41-46 (2021)
2) N. M. Geekiyanage et al., A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte -discocyte-echinocyte morphologies. PLoS One 14 e0215447 (2019)
3) P. Wong, A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. J Theor Biol 196, 343-361 (1999)
4) O. Rubin et al., Red blood cell

microparticles: clinical relevance. Transfus Med Hemother 39, 342-347 (2012).
5) M. Kay, Immunoregulation of cellular life span. Ann N Y Acad Sci 1057, 85-111, (2005).
6) 8)M. Foller et al., Erythrocyte Programmed Cell Death. IUBMB Life 60, 661-8 (2008)

重症 COVID 症例における身体活動量の追跡調査による社会復帰予測式の構築

研究責任者　兵庫医科大学病院
リハビリテーション技術部
理学療法士　　笹沼　直樹

１．はじめに

重症COVID-19症例は広範な肺傷害により呼吸療法離脱以降も労作時呼吸困難が持続する [1)]. これは身体活動制限をもたらし筋力および体力低下の原因となる. 今回我々はCOVID-19 症例における身体活動を定量化し社会復帰として自宅退院への予測式を構築することを試みた.

２．内容

（１） 対象

対象の選択基準は当院に入院した COVID-19 確定症例とする. 除外基準は並存疾患あるいは合併症として脳卒中,心不全,立位保持が不可能な整形外科的疾患および疼痛を有する患者, 協力が得られない認知症を有する患者とする.

（２） 評価項目

診療記録からの抽出項目は年齢（才), 性別, 身長（cm), 体重（kg), Body Mass Index (BMI) (kg/m^2), 在院日数（日), リハビリテーション実施期間（日), 人工呼吸器管理の有無, 人工呼吸器管理期間 （日), 退院転帰（自宅退院, 転院, 死亡)とした. 理学療法評価において測定した身体活動量指標は握力 (kg), Medical Research Council sum score (MRC-SS), functional status score for the ICU (FSS-ICU), intensive care unit mobility scale (IMS), Functional Independence Measure (FIM)とした. FIM はリハビリテーション開始時点および終了時点で測定し, その他の指標はリハビリテーション開始時点での測定とした.

（３） 統計解析

単変量解析では三群の退院転帰（自宅退院, 転院, 死亡）ごとの各指標の差異について, 間隔尺度については一元配置分散分析および Tukey の多重比較にて, 順序尺度については Kruskal Wallis 検定にて分析を行った. また多変量解析では単変量解析にて群間差を認めた指標を従属変数として, 死亡退院および生存退院(自宅退院と転院)を独立変数として分析を行い, さらに生存群内において自宅退院群と転院群を独立変数として分析を行った. 他変量解析には多重ロジスティック回帰分析を用いた.

３．成果

（１） 結果

対象の COVID-19 症例は 93 例であった. 年齢は 65.0±12.4 才, BMI25.4±5.5(kg/m^2)であった. 退院転帰ごとの人数では自宅退院が 16 例, 転院が 59 例, 死亡が 18 例であった.

診療録からの抽出項目における三群間の比較を表１に示す. 人工呼吸器装着患者数は死亡群で他の二群と比較し有意に多数であった. 関連して人工呼吸器管理期間も死亡群は延長傾向を示した.

理学療法にて測定した身体活動量指標についての三群間の比較を表２に示す.死亡群では入院時点から多くの身体活動量指標で低値を示した.特に,握力,MRC-SS などで示される筋力値の低下が認められた.ベッド上およびベッド周囲での活動状況を示す FSS-ICU や IMS は自宅退院群に比べ転院群で低値の傾向はあったが有意差は認めなかった.身体活動のうちの日常生活動作指標である運動 FIM では転院群が自宅退院群に比べリハビリテーション開始時および終了時ともに低値であることが示された.

多重ロジスティクス回帰分析では 93 症例を対象に生存転帰の予測式構築を試みた.単変量解析で有意差を認めた人工呼吸管理期間,握力,MRC-SS, FSS-ICU, IMS, 開始時運動 FIM, 開始時認知 FIM, 終了時運動 FIM, 終了時認知 FIM を独立変数とし,転帰（死亡,生存）を従属変数とした. 結果を表３に示す. 独立変数には MRC-SS が抽出され, 予測式の判別的中率は 92.7%であった.

次に生存退院症例 75 症例を対象に, 自宅退院の予測式構築を行った.単変量解析において自宅退院群と転院群にて有意差を認めた開始時運動 FIM および終了時運動 FIM を独立変数とし,転帰（自宅退院,転院）を従属変数とした.結果を表４に示す.両変数とも予測因子として抽出され,予測式の判別的中率は 89.1%であった.

（２） 考察

今回急性期 COVID-19 症例に対し,身体活動量指標を用いた社会復帰の予測式構築を試みた. COVID-19 症例は肺傷害に伴い重篤な酸素化障害を呈し身体活動の低減をもたらす[1].身体活動の低下はそれ自体が活動の制限因子となり,患者は低活動と運動機能の低下とが連続する負のサイクルに陥る[2].リハビリテーション医療は患者のこの様な機能障害に対して身体運動機能の再獲得をもたらし日常生活での自立度を高めるために適用される[3].

今回我々は COVID-19 患者の身体活動量低下の定量化とリハビリテーション開始時と終了時の日常生活自立度の可視化および社会復帰としての自宅退院のための予測式の構築を試みた.

症例全体では 93 症例のうち死亡症例が 18 症例 （19.3%） と極めて高い死亡率であること,自宅退院症例は 16 例（17.2%）と低値であること,転院症例が 59 例（63.4%）であることが確認できた.COVID-19 症例に対する入院治療措置は行政施策に基づき各医療圏域において施設ごとに明確な役割分担が図られている[4]. 当院は高度急性期病床を有する医療機関であり,2020 年 10 月から県域における重症症例のみを入院させること,SIRS-CoV-2 ウイルスの陰性化が確認され次第後方病院へ速やかに転院させることなどが病床運用の前提となった. したがって入院患者がもとより重症例が多数となったこと, 医療施策上当院では転院症例が多数とならざるを得ないことなどから自宅退院症例が限定的となったと考える.COVID-19 罹患症例のうち８割は軽症のまま治癒することは明らかにされてきており,今回の分析対象となった症例は COVID-19 患者の母集団の中でも特に重症化に至った, あるいは至ることが懸念された集団であることは充分に考えられる.

単変量解析では死亡群で人工呼吸管理症例が 18 例中 17 例（94.4%）であった. 治療経過において症状増悪を認めた場合,人工呼吸管理を行うことは当然の行為でありこの結果は妥当なものと考えられる. 転院群においては 14 症例 （23.7%),自宅退院群では 2 症例(12.5%)で人工呼吸管理がなされた.これらの症例は人工呼吸管理から生存転帰へと至った症例であり, 今後詳細な分析が求められる.

身体活動量では死亡群はリハビリテーション開始時点で既に低下が顕著であることが確認された.多くの症例でリハビリテーション開始時点で既に人工呼吸管理がなされ鎮静薬の

投与下にあることが要因と考えられる.転院群は自宅退院群に比べリハビリテーション開始時および終了時の運動 FIM が低値であることが確認された.転院群では人工呼吸管理症例割合が多いことが一因と考えられる.

多変量解析では生存転帰の予測に MRC-SS が抽出された. MRC-SS は四肢骨格筋の筋力を評価する指標であり,様々な活動の前提となる四肢骨格筋機能が生命予後を予測し得る指標として活用できる可能性が示唆される.社会復帰としての自宅退院では運動 FIM が高値であることが予測因子として示された.これは日常生活活動が可能な程度に,呼吸機能が改善していること,生活活動の基礎となる身体活動量の改善あるいは運動機能低下の回避が図られていることが自宅退院に関連することを示している.

今回, 生存予後への寄与因子として骨格筋機能が関連すること,社会復帰へは日常生活自立度が寄与する可能性が示唆された. COVID-19 の骨格筋機能並びに個別の身体機能と活動面の関連性については今後の課題と考える

4. まとめ

今回, COVID-19 症例における身体活動量および日常生活活動の変化を明らかにし, 社会復帰への予測式を構築することを目的に研究を行った. 生命予後へは骨格筋機能が関与することおよび社会復帰へは日常生活活動自立度が関与することが示唆された.

謝辞

本研究は中谷医工計測技術振興財団「新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム」の支援のもとに実施した. 衷心より謝意を申し上げます.

表 1. 診療録からの抽出項目での群間比較

		自宅退院 (n=16)	転院 (n=59)	死亡 (n=18)
性別 (女性/男性)	(-)	2/14	19/40	9/9
年齢	(才)	63.2 ± 14.6	63.5 ± 12.3	71.2 ± 8.7
身長	(cm)	165.9 ± 8.9	166.7 ± 9.1	160.3 ± 9.6 †
体重	(kg)	68.5 ± 9.6	70.0 ± 14.4	67.3 ± 16.9
BMI	(kg/m^2)	25.1 ± 5.1	25.3 ± 5.4	26.2 ± 6.3
在院日数	(日)	23.1 ± 12.8	21.0 ± 29.5	19.7 ± 12.2
リハビリ期間	(日)	17.9 ± 11.1	19.0 ± 28.0	17.7 ± 11.6
人工呼吸器装着患者数	(人)/(%)	2.0 / 12.5	14.0 / 23.7	17.0 / 94.4*, †
人工呼吸管理期間	(日)	1.6 ± 5.1	3.3 ± 9.6	17.2 ± 13.2*, †

BMI: body mass index, MRC-SS: Medical Research Council sum score
*: $p < 0.05$ vs. 自宅退院, †: $p < 0.05$ vs. 転院, §: $p < 0.05$ vs. 自宅退院

表 2. 身体運動機能評価項目の群間比較

		自宅退院 (n=16)	転院 (n=59)	死亡 (n=18)
握力	(kg)	28.5 ± 9.1	20.3 ± 18.6	1.4 ± 4.1*, †
MRC-SS	(-)	56 (47.3-60)	56 (44.5-59)	0 (0-0) *, †
FSS-ICU	(-)	18 (13.8-28)	7 (6-12)	1 (0-2.25) *, †
IMS	(-)	1.5 (1-2.25)	1 (1-1)	0 (0-0) †
開始時 運動FIM	(-)	37 (14.5-51)	13 (13-15) §	13 (13-13) *
開始時 認知FIM	(-)	35 (35-35)	35 (13-35)	5 (5-5) *, †
終了時 運動FIM	(-)	67 (62-79)	44 (22-56.5) §	13 (13-13) *, †
終了時 認知FIM	(-)	35 (35-35)	35 (34-35)	5 (5-5) *, †

MRC-SS: Medical Research Council sum score, FSS-ICU: functional status score for the ICU, IMS: intensive care unit mobility scale, FIM: Functional Independence Measure
*: $p < 0.05$ vs. 自宅退院, †: $p < 0.05$ vs. 転院, §: $p < 0.05$ vs. 自宅退院

表３．生存転帰の予測式

変数	偏回帰係数	有意確率	オッズ比	オッズ比の95%信頼区間	
				下限	上限
MRC-SS	0.106	＜ 0.01	1.112	1.053	1.174

MRC-SS: Medical Research Council sum score

表４．社会復帰の予測式

変数	偏回帰係数	有意確率	オッズ比	オッズ比の95%信頼区間	
				下限	上限
開始時運動FIM	-0.080	＜ 0.05	0.923	0.867	0.983
終了時運動FIM	-0.098	＜ 0.05	0.907	0.848	0.970

FIM: Functional Independence Measure

参考文献

1) Gattinoni L, et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? Intensive Care Med 2020, 46, 1009-1102.
2) Huang C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020, 395, 497-506.
3) Disser NP, et al. Musculoskeletal Consequences of COVID-19. J Bone Joint Surg Am 2020, 102, 1197-1204.
4) 厚生労働省地域医療構想に関するワーキンググループ. 新型コロナウイルス感染症対応を踏まえた 今後の医療提供体制の構築に向けた考え方. https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000711478.pdf (2021年7月1日)

コロナウイルスによる次のパンデミックを回避するsiRNA核酸の開発

研究責任者　東京大学　大学院理学系研究科
生物科学専攻
准教授　　程　久美子

１．はじめに

現在、新型コロナウイルスであるSARS-CoV-2による感染症(COVID-19)に対する治療薬の開発は大手製薬会社を中心に世界的に精力的に進められている。しかしながら、これまでの医薬品開発では、1つの薬を開発するには10年以上の年月と数百億円以上の費用が必要とされている。また、SARSやMERSといった重症肺炎コロナウイルス感染症に対する特異的な治療法はいまだに存在しない。さらに、コロナウイルスのようにRNAをゲノムとして持つウイルスに共通の特徴であるが、ゲノムRNAには変異が入りやすいため、仮に治療薬が開発されても、時間が経ってしまえばウイルスに変異が入ることで、効果が認められない可能性は高い。一方で、近年の次世代シークエンサー技術の進歩によりウイルスのゲノム情報が簡単に解読されるようになり、ゲノム情報を利用した治療法の開発が急速に進められている。その中でも、ゲノムから転写されたメッセンジャーRNA（mRNA)と相補的な塩基配列をもち、それを切断するsmall interfering RNA（siRNA)によるRNA干渉（RNA interference, RNAi）法[1)]を利用したsiRNA核酸は、ゲノム情報さえわかれば１年という短時間での開発も可能とされ、比較的安価に安定的に製造できることから従来の医薬品の枠をはずれた化合物として位置づけられる。特にコロナウイルスはRNAをゲノムとして持つウイルスであるため、ゲノムから産生されたタンパク質を標的とするワクチンなどよりもゲノムRNAを標的とするほうがより直接的な効果が期待できる。

２．目的

研究の目的は、コロナウイルスに対するsiRNA核酸を設計・開発することである。siRNAとは2018年に世界で初めて認可された核酸医薬品[2)]で、最短１年間で実用化可能な次世代型核酸である。SARS-CoV-2はおよそ3万塩基長のRNAゲノムをもつが、すでにデータベースに登録されているゲノム配列だけでも3万種類ほど存在する。RNAウイルスは、突然変異率が高いために適応進化が著しいウイルスのファミリーである。RNAゲノムをもつウイルスの宿命であるが、コロナウイルスも常に進化しながらそのゲノム配列を改変して生き延びている。そこで、本研究では多様化したSevere Acute Respiratory Ayndrome Coronavirus (SARS-CoV)-2の配列を比較解析し、高度に保存された領域を標的としたsiRNA核酸の開発をめざす。感染症は、過ぎてしまえば忘れられてしまう疾患である一方で、現在蔓延しているSARS-CoV-2は2003年に感染拡大したSARS-CoV、2013年のMERSがゲノム変異を繰り返した結果、再燃してパンデミックをひき起こしたと考えられている。したがって、最も保存されているゲノム領域を標的としたsiRNAは、将来的に高い確率で起こりえる次のパ

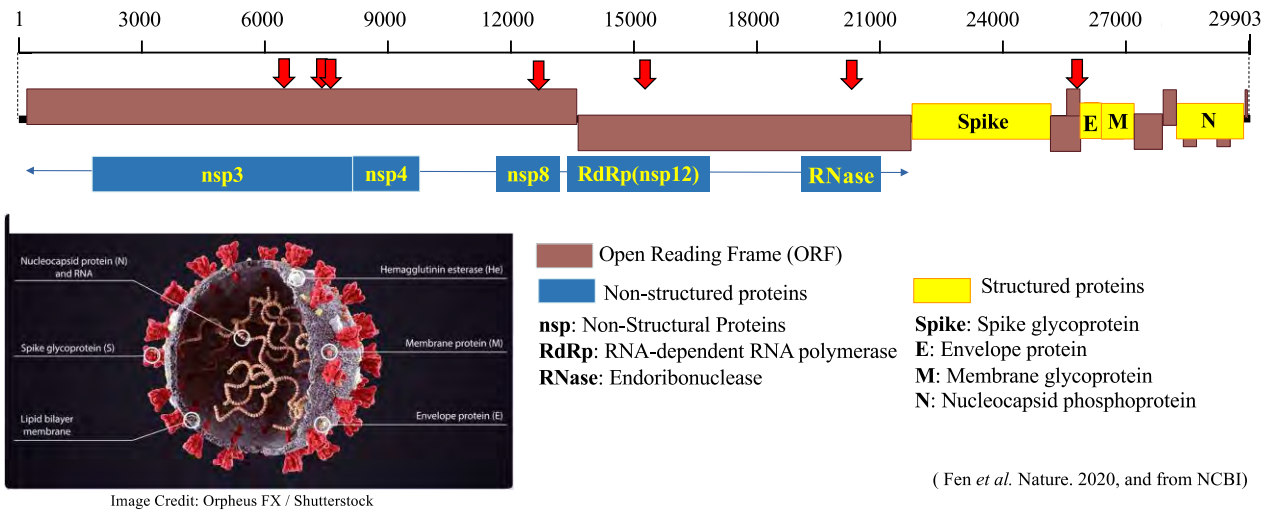


Image Credit: Orpheus FX / Shutterstock

(Fen *et al.* Nature. 2020, and from NCBI)

ンデミックにも対応可能な siRNA 核酸となり得る可能性がある。

3． 成果

(1) SARS-CoV ゲノム配列解析

コロナウイルスの遺伝的多様性を調査するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI)および Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) に登録されている 324 の SARS-CoV (29751 bp)、595 の Middle East Respiratory Syndrome (MERS) (30111 bp)、29287 の SARS-CoV-2 (29903 bp) で保存されているコンセンサス配列を特定するために、全ゲノム配列の Multiple Sequences Alignment (MSA) を実施した。共通領域に siRNA を設計するには、最低 19 塩基が一致している必要があるが、3 つの異なるタイプの CoV 間で完全に共通の 19 塩基配列は存在しないことが明らかになった。そこで、まず SARS-CoV-2 に焦点をあて、2020 年 5 月 16 日までに GISAID に登録された約 29,000 の SARS-CoV-2 配列を用いて、19 塩基の保存配列を検索した。

SARS-CoV-2 には 14 個の ORF があり、その 3 分の 2 は 16 個の非構造タンパク質(nsp 1～16)をコードしており、ウイルスプロテアーゼによって個々のポリペプチドに分断される 2 つの大きなポリタンパク質 (Orf1a および Orf1b) として転写される (図)。残りの 3 分の 1 は、9 つのアクセサリータンパク質と 4 つの構造タンパク質 (スパイク (S)、エンベロープ (E)、膜 (M)、およびヌクレオカプシド (N)) をコードする [3]。その中で、ウイルス表面のスパイクタンパク質は、SARS-CoV-2 の宿主細胞への侵入を仲介する。細胞受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) との直接接触を仲介する受容体結合ドメイン (RBD) によって細胞に組み込まれる。これらの中には、19 塩基の完全保存配列が 37 箇所に見出された。しかし、ヒトをはじめとする哺乳類細胞では、RNAi 効果の高い siRNA 配列は限られている [4]。37 箇所の中で、ヒト細胞で有効であると考えられる配列は、nsp3 に 3 箇所、nsp8 に 1 箇所、Rdrp に 1 箇所、RNase に 1 箇所、E ドメインの手前に 1 箇所の計 7 箇所であった (図、赤矢印)。一方、スパイクタンパク質は、宿主細胞への侵入と感染力の変化における極めて重要な役割をもつが、突然変異に対して最も感受性の高い領域であり、実際に最も変位率が高く、完全に保存された 19 塩基配列は存在しなかった。そこで、スパイク領域に対しては、最も保存性の高い 19 塩基長の配列を選択し、いずれの変異配列にも有効と予想される siRNA 配列設計を行った。

(2) RNA 干渉作用のレポーターアッセイ

現在、7 つの保存配列に対するレポーターアッセイを実施している。少なくとも 5 箇所では効率よく標的 RNA を抑制することが明らかになった。さらに、スパイク領域に対して設計した

siRNA は部分的に保存されていない配列にも有効であることが明らかになった。

４．まとめ

本研究により、およそ 30,000 種の SARS-CoV-2 に共通に保存された配列を明確にすることができた。さらに、それらの一部に対する siRNA の有用性をレポーターアッセイで確認することに成功した。さらに、スパイクドメインにおける最も保存率の高い配列を用いることで、完全に保存されていなくても抑制可能な siRNA の設計に成功した。現在、SARS-CoV-2 感染細胞における、これらの siRNA の有用性を確認している。このような保存配列を用いた siRNA は、次のパンデミックにおける SARS-CoV 感染に対する治療薬として期待できると考えられる。

謝辞

本研究は、中谷医工計測技術振興財団のサポートによって実施した研究であり、深謝いたします。

参考文献および発表論文

1) Winkle M, EL-Daly SM, Fabbri M, and Calin GA. Noncoding RNA therapeutics-challenges and potential solutions. Nat Rev Drug Discov. 1-23, 2021.
2) Adams D, Gonzales-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, et al. N Engl J Med. 379, 11-21, 2018,
3) Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 579, 265-269, 2020.
4) Ui - Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. Nucleic Acids Research, 32, 936-948, 2004.

早期肺炎発見に向けた，装着型聴診器による呼吸音測定システムの構築

研究責任者　東京大学大学院
工学系研究科
特任研究員　　奥谷　智裕

１．はじめに

新型コロナウイルス感染症の蔓延は世界規模で人々の健康や生活様式に大きく影響を与えている。新型コロナウイルス感染症に罹患すると、発熱や空咳、倦怠感といった症状が現れることが多いが、中には感染しても無症状で肺炎が進行し急に重篤になるケースも報告されている。間質性肺炎を患うと、その部分に相当する呼吸音の変化や新しい副雑音成分が発生する。そのため、日常的に呼吸音をモニタリングできれば、感染疑いのある人を早期に発見し、集団感染発生の抑制や患者の重症化の予防につながることが期待される。

呼吸音の測定は、聴診器を用いた医療従事者による診断で広く普及されている。在宅で呼吸音の測定を行い、データを取得および病院へ送信するには、体温計や血中酸素濃度計のような、呼吸音の情報を簡易的に取得できる機器システムが求められる。聴診器を安価で作製する方法として、近年では 3D プリンタ技術を用いることで、実際に医療で使われているものに近いデバイスを簡単に作製できることが報告されている[1]。そこで本研究では、3D プリンタを用いて簡易的な聴診器を作製し、デバイスと皮膚との装着界面を皮膚と同じくらい柔らかい密着材料でコートすることで、椅子に座るなどの静止した状態で、呼吸をストレスなく気軽に取得できるシステムの構築を目指した。

２．内容

呼吸音を測定する方法は、肌に聴診器を密着させることで、肺からの音の振動を取得することである。従来の聴診では、測定時に聴診器を皮膚に押し当てている。これを長期的に行うには、ベルトなどでデバイスを圧迫固定させる必要があった。常時ストレスなく肌に密着させるには、聴診器自体の装着感を減らすことが重要である。これを実現するために、圧迫せずにデバイスと皮膚が密着できる柔らかい界面を作製した。生体に近い柔らかさをもち、かつ生体適合性のあるシリコーンエラストマー・ゲル材料を用いた。密着界面を柔らかくすることで、聴診器自体の装着時の装着感を低下させることができる。

また 3D プリンタを用いることで、複数種の音（振動）伝達構造をもつ聴診器の作製を行った。具体的には、皮膚との接触界面面積の変化や、振動伝達媒介を空気、水、エラストマーに変化させ、体内音の取得を行った。

３．成果

長期装着できる聴診器として、皮膚に接触させる振動板部分に密着層の導入を行い、その際の得られる信号の評価を行った。密着層として、生体と同じほど柔らかく、生体適合性の高いシリコーン材料を用いた。しかし Ecoflex のようなエラストマーでは、接着力が十分でなく長期装着が難しかったため、シリコーンゲル（Silbione）を用い

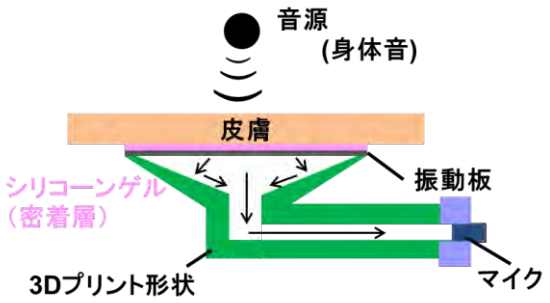


図 1　密着層コートした漏斗型聴診器デバイス。体内の音を集音し、音圧をあげた後、マイクロフォンで電圧に変換し、

た。シリコーンゲルはスピンコート（4000 rpm30 秒）により、皮膚と接触する振動板上に 125 μm コーティングされた。

聴診器の構造として、市販の聴診器と同じ漏斗型のものを設計、および 3D プリンタで作製した後、市販の直径 4.5 cm、厚み 100 μm の振動板を取り付け、コンデンサマイクロフォンを音が漏れないように装着し、マイクロフォンから増幅器を通してオシロスコープで電圧を読み取った（図 1）。マイクロフォンの固定のための柔らかいコネクタを 3D プリンタで作製した。

密着層が得られる信号に与える影響として、シグナルが大きく判断がしやすい心音を測定した。図 2 に聴診器を身体に押し当てたときに測定した心音(a)と、密着層により皮膚に接着させたときの心音(b)を示す。これらの信号を 10-500 Hz のバンドパスフィルタで処理した後の SN 比(Signal to Noise Ratio、20log(信号電圧/雑音電圧))は、押し当てている場合は 15.3、密着層で接触している場合は 24.5 であった。この結果から、125 μm の薄い密着層は、聴診器に長期装着性を付与しつつ、信号品質を損なわないことがわかった。

次に聴診器の大きさを変えた際の、取得できる信号の評価を行った。3D プリントする造形を小さくし、また振動板は CO_2 レーザーで 12 W 300mm/s の条件で直径 2.5cm にカットされた。しかし、小型化した聴診器では、生体音を取得することは困難であった。これは皮膚と密着する面積が小さくなったために、集音がうまくいかなかったからで

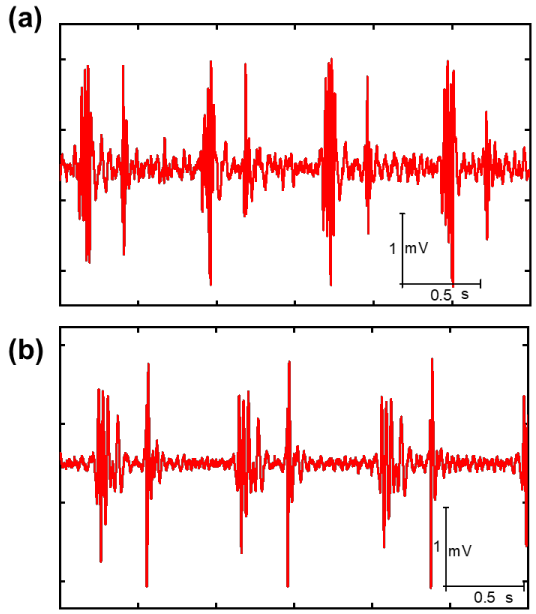


図 2　接着層をコートした聴診器デバイスでの心音測定（a）押し当て時（b）接着層で密着しているとき

あると考えられる。

さらに、聴診器全体をエラストマーで作製し、内部を水で埋める構造[2)]や、マイクの振動板を金属切削で露出させ、エラストマー材料で界面を覆う構造[3)]に関しても作製し、評価を行った。しかし、前者の構造では、内部が水で満たされているため、装着感（重さ）を感じ、長期装着は難しかった。後者の構造では、ノイズを多く拾ってしまい、SN 比が低下してしまった。

以上の結果から、音を反射させ音圧を増加させる漏斗型の構造を用いることとした。作製した接着型聴診器デバイスを右胸に装着し、座った状態で呼吸時の音の取得を行った（図 3）。呼吸前後で

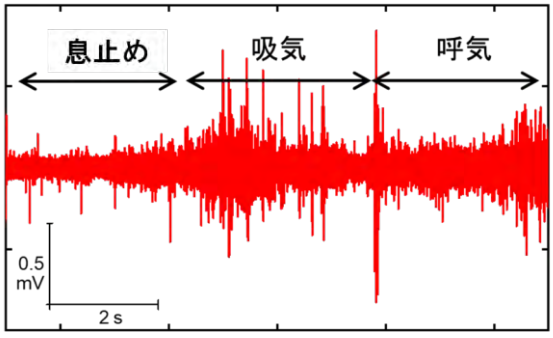


図 3　装着型聴診器による、静止した状態の呼吸音測定

得られる電圧波形が変化しており、デバイスを押し当てることなく、静止した状態で呼吸活動を取得できた。

４．まとめ

3D プリンタで造形した漏斗型構造による集音とマイクロフォンによる電圧読み取りで、体内の音の測定を行った。作製したデバイスと皮膚の界面に、密着力のある生体適合性の高いシリコーンゲルを 125 μm コーティングすることで、デバイスを押し当てる必要なく、安定して測定できる装着性を付与することができた。また密着層による、信号の劣化は見られなかった。

謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の研究助成を受け、実施いたしました。貴重なご支援をいただき深く感謝申し上げます。

参考文献

1) A. Pavlosky, et al., PLoS One 13, e0193087 (2018).
2) S. Y. Hong, et al, Adv. Funct. Mater. **29** [6], 1807679 (2019).
3) S. Shimizu, et al., Acoust. Sci. Technol. **30** [2], 139 (2009).

新型コロナウイルス検査における偽陰性判定の低減を目的とした小型デバイスの開発

研究責任者　同志社大学　理工学部
化学システム創成工学科
教　授　　橋本　雅彦

１．はじめに

新型コロナウイルスの感染拡大を抑制するために PCR 検査の数をさらに増やしていくことの重要性が叫ばれて久しいが、日本疫学会の報告によると、ウイルス量が少ない感染の初期段階では 30～40%もの偽陰性の判定結果(陽性であるにもかかわらず陰性と判定されてしまう診断結果）が現行の PCR 検査では出てしまうことが指摘されている。新型コロナウイルスの PCR 検査には、先行の定量 PCR として広く普及しているリアルタイム PCR が用いられているが、偽陰性の判定結果が生じてしまう最大の要因は、リアルタイム PCR の検出感度の不足であると考えられる。

後発の定量 PCR であるドロップレットデジタル PCR（以下、ddPCR と略す）は、検体中の標的核酸分子を無数の微小な油中水滴（ドロップレット）に個別に封入し、一分子レベルから PCR 増幅を行う。ddPCR は、リアルタイム PCR よりも検出感度と定量精度に優れ、原理的にはたった 1 個のウイルスでも検出することが可能である。現在、海外の数社より ddPCR 分析システムが市販されているが、いずれの ddPCR システムも複数の大型装置より構成されているため高価であり、操作も煩雑且つ分析には長時間を要する。このような理由から、ddPCR を新型コロナウイルス感染の検査に適用すれば市中感染の拡大へとつながる偽陰性の判定結果を著しく低減させることができるにもかかわらず、ddPCR はリアルタイム PCR に取って代わる新型コロナウイルス感染症の検査手段とは現在のところ成りえていない。

上記した現行の ddPCR が抱える問題点が解決されれば、偽陰性判定結果が生じる可能性が大幅に低減された新型コロナウイルス感染の検査体制が構築され、ひいては感染拡大の抑制へとつながることが期待される。本研究提案では、ddPCR 分析フローを構成する主要工程を、たった 1 枚の名刺サイズのマイクロ流体チップを用いて実行することを可能とする、小型で利便性が高く、さらに短時間で検査結果を出力することができる低コスト ddPCR システムを構築することを目標として研究を実施した。

２．内容

ddPCR のワークフローは、以下の３つの工程からなる。①サンプルドロップレットの生成、②ドロップレットの反復温度制御に基づく PCR 増幅、③蛍光性ドロップレットの検出。本研究では、1 枚の小さなカートリッジ内で上記３工程をプロセッシングすることを可能とするマイクロ流体デバイスを新規に作製した。図１に示すとおり、本カートリッジは、４つのレイヤー（Layer 1, 薄板ガラス基板（最下層）；Layer 2, 両面粘着 PET フィルム；Layer 3, ポリカーボネート (PC) 基板；Layer 4, ポリジメチルシロキサン(PDMS)

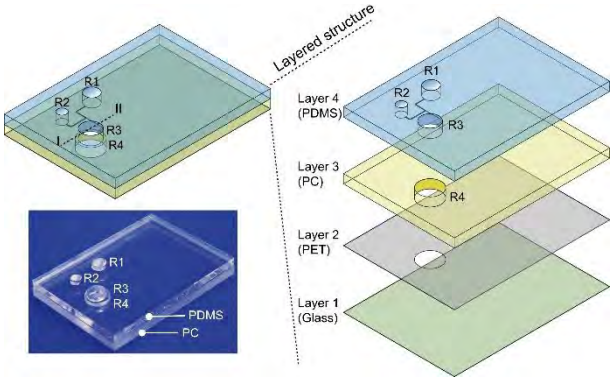


図１．作成したマイクロ流体カートリッジ

シート（最上層)）より構成される。PDMS シートの下側表面にはソフトリソグラフィー技術により T 字流路が作製されおり、流路の終端には油相リザーバー、水相（PCR 反応液）リザーバー、アウトレットリザーバーが配置されている。

減圧制御によりアウトレットリザーバー方向に流動していった油相および水相は、流路の T 字ジャンクション部において合流し、サイズ均一性の高いドロップレット(油中水滴)が生成した。オンラインでアウトレットリザーバーへと輸送されていったドロップレットは、比重の差により PC レイヤー中の反応チャンバーへと導入さていき、最終的に最下層の薄板ガラス表面上に配置された。ドロップレット生成完了後、粘弾性特性により PC 基板に可逆的に接着されていた PDMS シートを PC 基板から剥がし、反応チャンバーを有するガラス/PET/PC アッセンブリをフラットベッド型サーマルサイクラーのヒートブロック上に配置した。PCR 増幅のためのサーマルサイクルを施した後、本アッセンブリを蛍光顕微鏡のステージ上に設置し、ドロップレットの蛍光画像を取得した。

３．成果

作製したマイクロ流体カートリッジは、15 分以内に 5000 個ものサイズ均一性の高いドロップレット（平均粒径 ± 標準偏差, 67 ± 0.9 μm）を生成させ得ることを確認した。SARS-CoV-2 RNA の塩基配列の一部を模した塩基配列を持つ

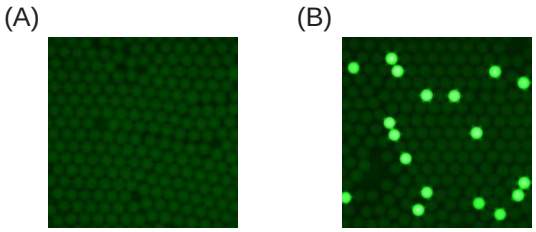


図２．PCR 後のドロップレットの蛍光画像
(A) ブランクテスト（λ = 0）
(B) ポジティブコントロール（λ = 0.1）

人工合成 RNA をサンプルとして用い、ドロップレット 1 個当たりの RNA の平均分子数（λ）が 0.1 個となるように PCR 反応液を調製し、本カートリッジを用いて ddPCR 分析を行った。ポアソン回帰に基づくと λ = 0.1 となるようにサンプル調製した場合、ドロップレット全体の 90.5%が標的 RNA 分子を含まず、9.0%のドロップレットが RNA 分子を 1 個含むことになる。2 個以上の RNA 分子を含むドロップレットは全体の 0.5%以下であるので、PCR 反応後に蛍光シグナルを示すドロップレットの多くは 1 個の RNA 分子由来の PCR プロダクトを含んだドロップレットであると考えることができる。

まず、標的 RNA を加えずに ddPCR 分析を行った場合は、明瞭な蛍光シグナルを示すドロップレットは確認されなかった(図２(A))。次に、λ = 0.1 となるように調製した試料を測定したところ、一部のドロップレットが強い蛍光シグナルを示した(図２(B))。前述したとおり、これらの蛍光性ドロップレットは、単一 RNA 分子由来の PCR プロダクトを含んだドロップレットであると考えられる。1 回の測定につき 1000 個程度のドロップレットを無作為に選択し、全ドロップレット中に占める蛍光性ドロップレットの数的割合を求めた。この実験を 5 回繰り返したところ、蛍光性ドロップレットの数的割合はそれぞれ 7.8, 8.4, 8.6, 8.7, 8.2%となり、いずれの値もポアソン回帰から予測される 95%信頼区間（7.6−11.4%）以内であった。以上のように、本カートリッジを用いることにより、高い精度で

単一分子レベルの SARS-CoV-2 RNA を検出し得ることが実証された。

以上の研究成果は、英国王立化学会 *Analytical Methods* 誌の 13 巻 8 号に掲載され、当該巻号の表紙に選定された。[1)]

４．まとめ

本研究では、たった 1 つの SARS-CoV-2 RNA の検出を簡便かつ低コストで実現するために、異なる材料基板が積層されたハイブリッドタイプのマイクロ流体カートリッジを開発した。PDMS マイクロ流体レイヤーで生成したドロップレットは、カートリッジ最下層の薄板ガラス基板表面にオンラインで移送された。このカートリッジ仕様は、カートリッジを PCR サーマルサイクラーのヒーティングブロックおよび汎用蛍光顕微鏡の観察ステージに直接設置することを可能にした。これにより、ddPCR 分析のワークフローにて通常必要とされる上記した ddPCR の主要工程間における慎重かつ長時間を要するマイクロピペットを用いたマニュアル的なドロップレットのハンドリングが不要となった。開発したカートリッジの操作性をさらに向上させることにより、ウイルス量の少ない感染の初期段階における高感度・高精度 PCR 検査ツールとしての本カートリッジの利用が今後期待される。

謝辞

この研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団の助成を受けて遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献および発表論文

1）“Convenient microfluidic cartridge for single-molecule droplet PCR using common laboratory equipment”, Hirokazu Takahara, Hiroo Matsushita, Erika Inui, Masashi Ochiai and Masahiko Hashimoto, *Analytical Methods*, **13**, 974-985 (2021).

公益財団法人
中谷医工計測技術振興財団

新型コロナウイルス感染症対策助成プログラム　研究報告書

発　行　令和３年10月
発行所　公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団
〒141-0032　東京都品川区大崎一丁目2番2号　アートヴィレッジ大崎セントラルタワー8階
ＵＲＬ　https://www.nakatani-foundation.jp