

# 新型コロナウイルス感染症等の 核酸増幅(PCR等)検査技術

～ 感染症病原体の遺伝子検査における  
コンタミネーション・感染防止対策を中心に ～

長野県環境保全研究所

小野諭子 塚田竜介

# はじめに

「感染症の病原体」が含まれた検体の「遺伝子検査」を行う場合、次の2点に関しての注意が必要となります。

- ☑ 自分が感染しない・周囲の人を感染させない
- ☑ 各検査工程で、検体に外からの遺伝子や検査の阻害となるものをコンタミさせない・遺伝子（特に増幅産物）で周辺を汚染しない

## PPEの着脱(特に脱衣)

検査をしているのは「新型コロナウイルス疑い検体」であるだけで、中にどんな病原体が入っているかわかりません。

どんな病原体が入っていても大丈夫な脱衣をしましょう。

## 機器や器具などの特性を理解

特に感染性がある状態の検体を取り扱っている間は、適正なものを選択し、適正に取り扱いましょう。

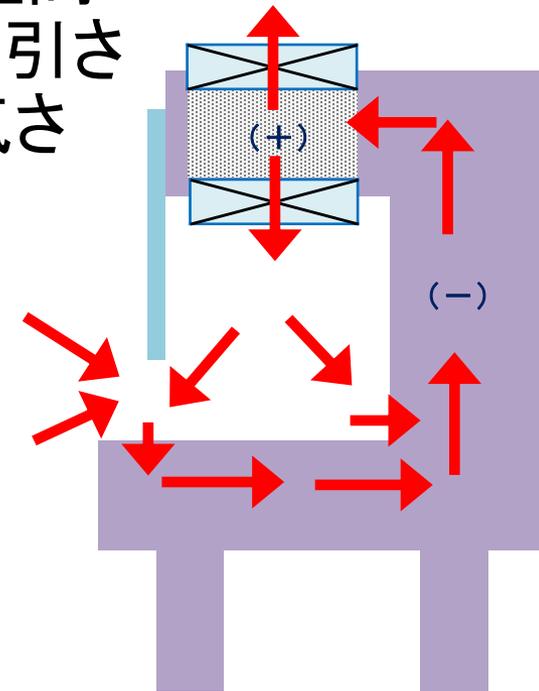
## コンタミネーションリスク確認

コンタミネーションリスクの高い操作・器具等の取り扱いを理解しましょう。

- 飛沫による汚染拡大  
安全キャビネットの気流と飛沫拡散状況  
マイクロピペットの種類による飛沫発生 等
- 器具の取扱方法、検査者による汚染拡大  
マイクロチューブの特性、無菌操作 等

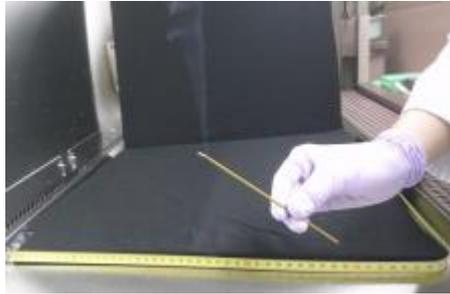
# 飛沫による汚染拡大：安全キャビネット

- 安全キャビネットは、HEPAフィルタを通した清浄な空気や、ガラス扉・エアバリアによる無菌環境の構築と封じ込めにより、病原体を取り扱う検査者の感染を防止する実験台
- Class II A以上の性能の実験台では、内部の上部から吸気HEPAフィルタを通して実験空間に流入された空気が、背面・手元下部で吸引され、HEPAフィルタを通して再流入又は排気されることで、病原体の周辺拡散を防ぐ



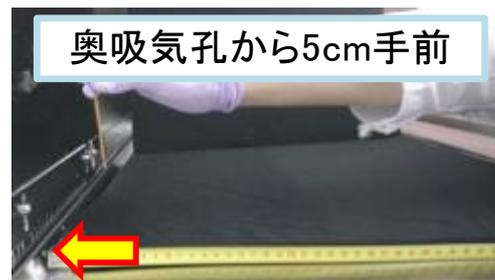
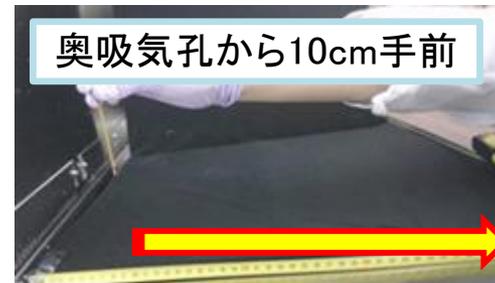
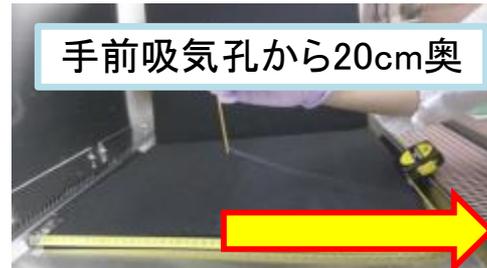
# ファン稼働時の安全キャビネット内の気流確認

ファンOFF



無風状態では  
線香の煙は上に

ファンON



- ・ 当所の安全キャビネットでは、ファン稼働時、奥側から5cm程度までの空気は奥側に流れるものの、実験台内のほとんどの空気は手前吸気孔に向かってきました。

- ・ 実験台前にはガラス扉があり、**作業は扉から20cm程度までで行う**こととなるため、作業空間の空気はすべて手前吸気孔のある検査者側に向かってきます。



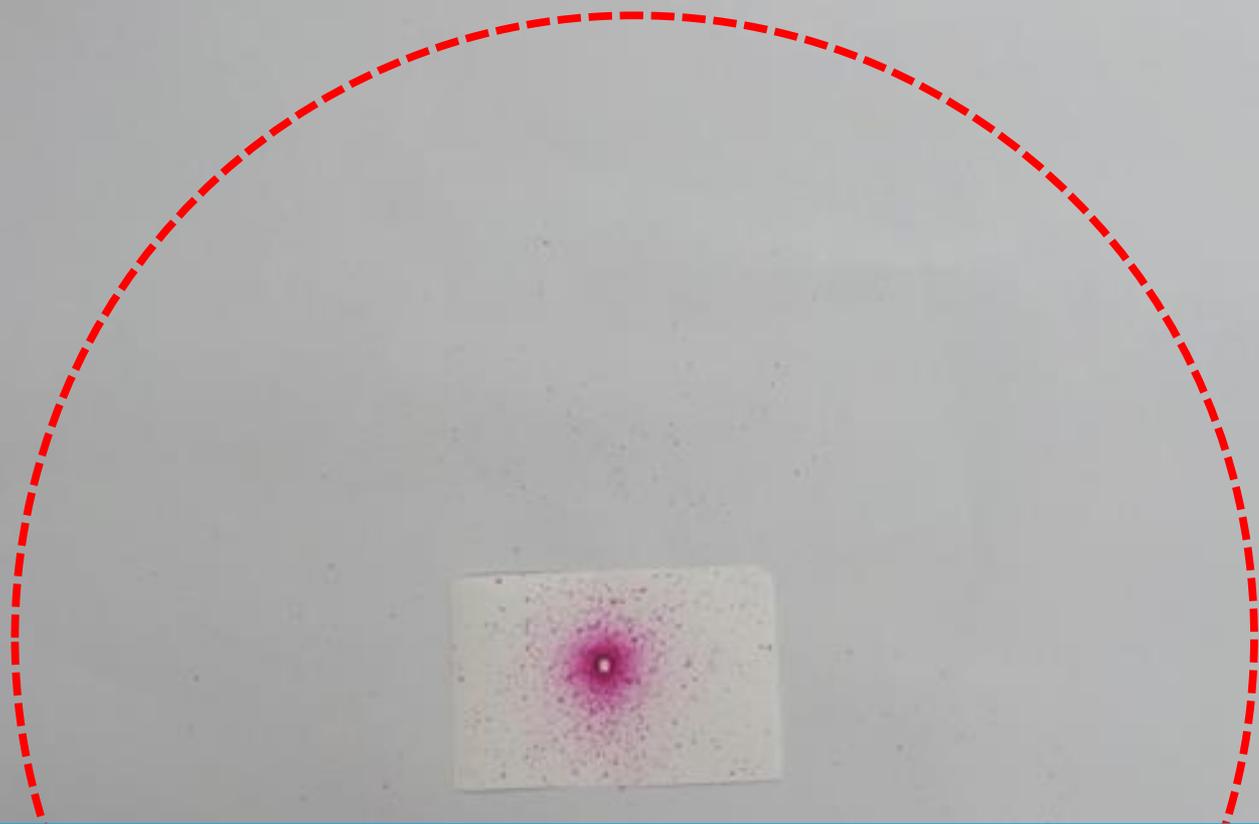
# 飛沫の飛散状況確認



## <方法>

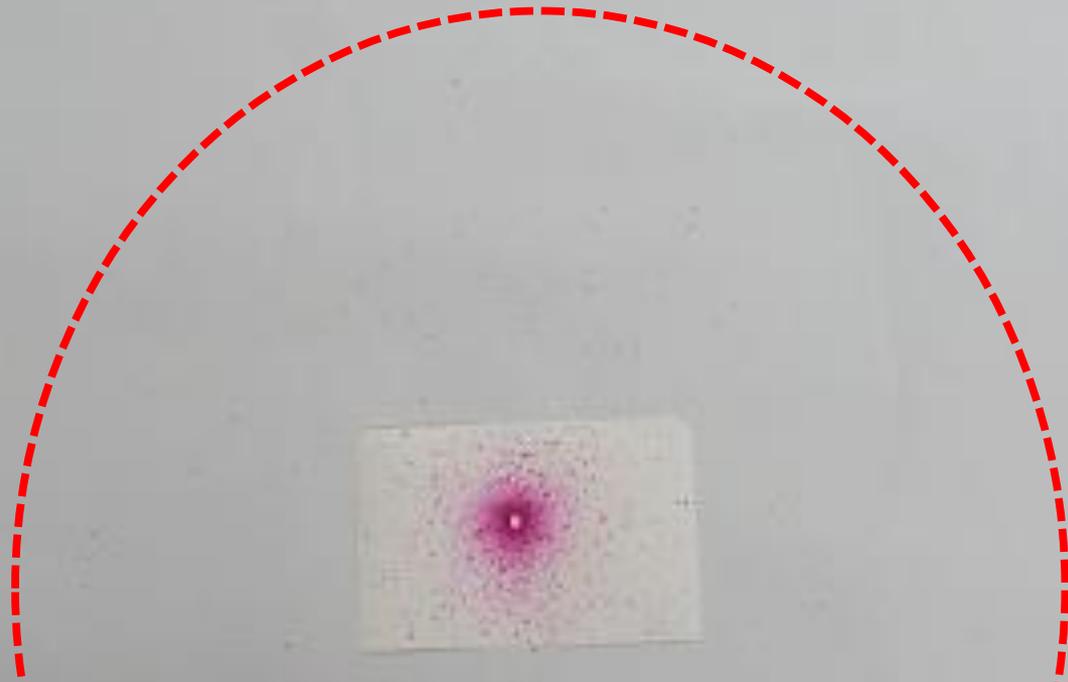
- 1 安全キャビネット内及び手前の吸気孔の前側に模造紙を貼り付ける。
- 2 200  $\mu$ Lチップでフクシン液(グラム染色液)を少量吸い上げ泡を作る。
- 3 手前吸気孔奥側10cmの位置に置いた96ウェルプレート(ろ紙を貼り付け、中心付近部分のみ穴をあけたもの)の約1cm上(実験台から約3.5cm上)で泡を1,000回作製・破裂することにより飛沫を発生させる。
- 4 ファン稼働前及び稼働開始10分後の2回実施し、飛散状況を確認。

# 飛沫拡散状況：ファンOFF



左右、奥、手前の全方向に同心円状の飛沫あり

# 飛沫拡散状況：ファンON



ファンOFFのときと比べ、左右の飛散距離は狭くなり、  
奥より手前吸気孔方向の飛沫が多かった

# 安全キャビネットのファン稼働による手前側への飛散量変化

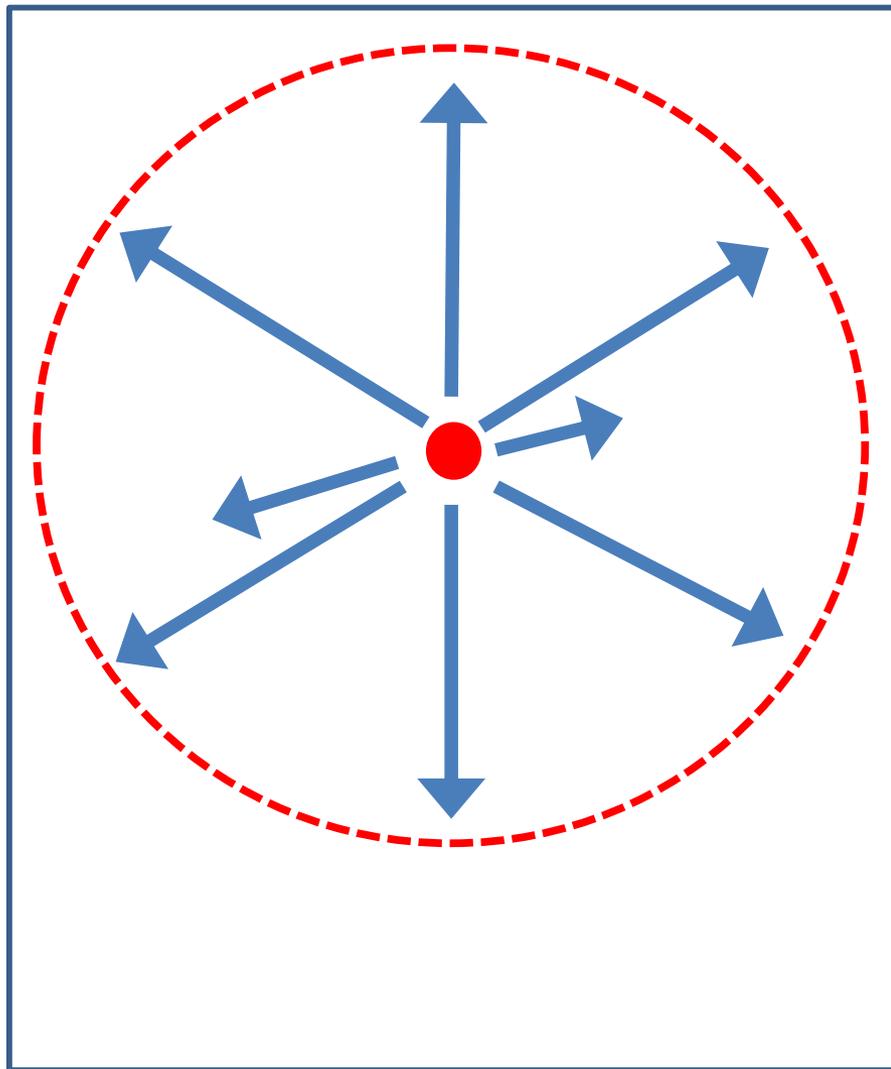
ファンOFF

ファンON

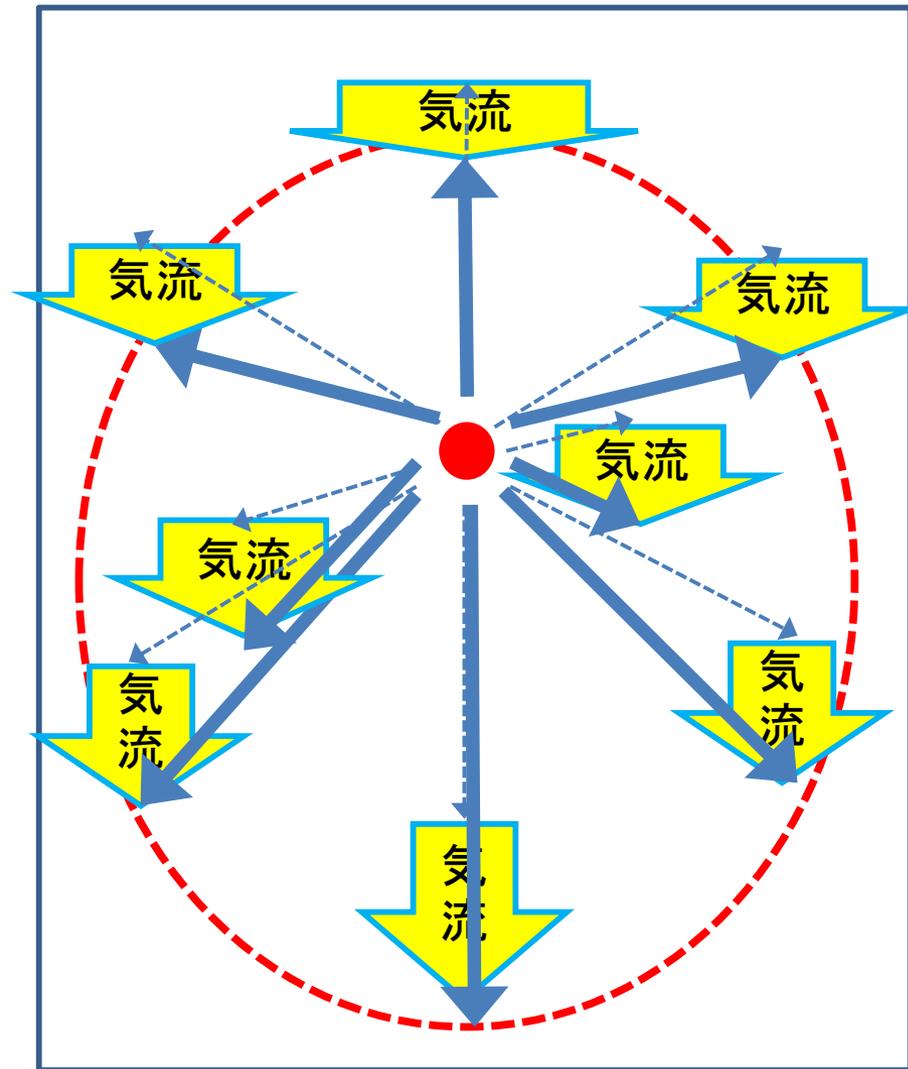


- ・実験台内に入れている前腕部分も飛沫で汚染されます。
- ・ファンONの方が検査者の前腕への飛沫曝露量が増えます。  
→ 安全キャビネット使用で検査者が完全に守られるわけではありません。

# ファン稼働有無と手前側への飛散

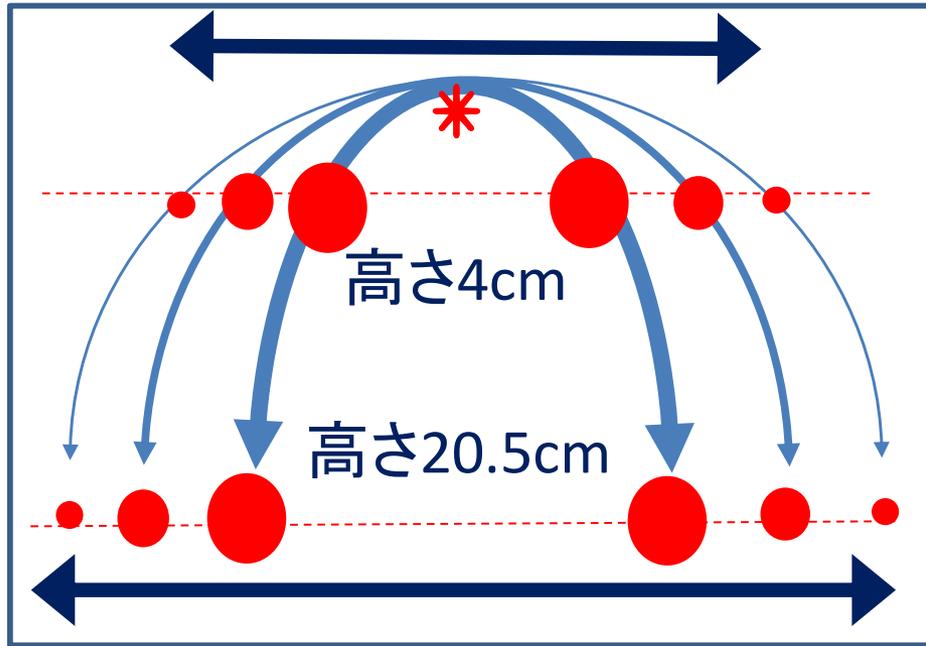


ファンOFF



ファンON

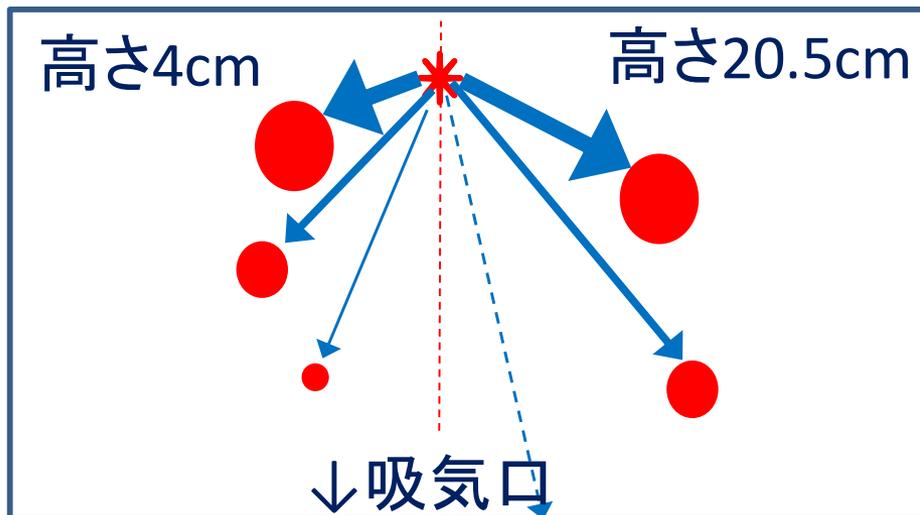
# 操作(飛沫発生)位置の高さによる飛散範囲



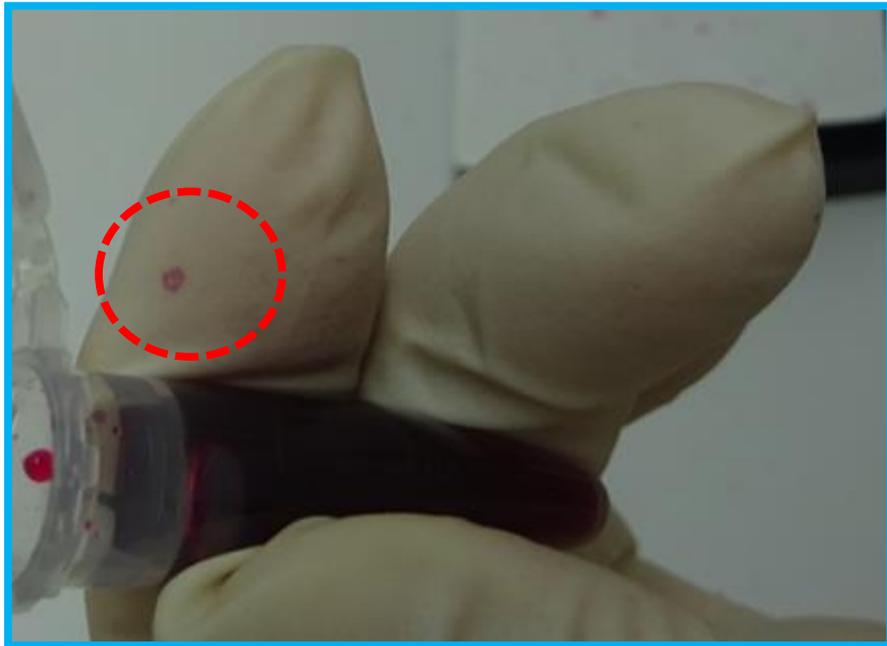
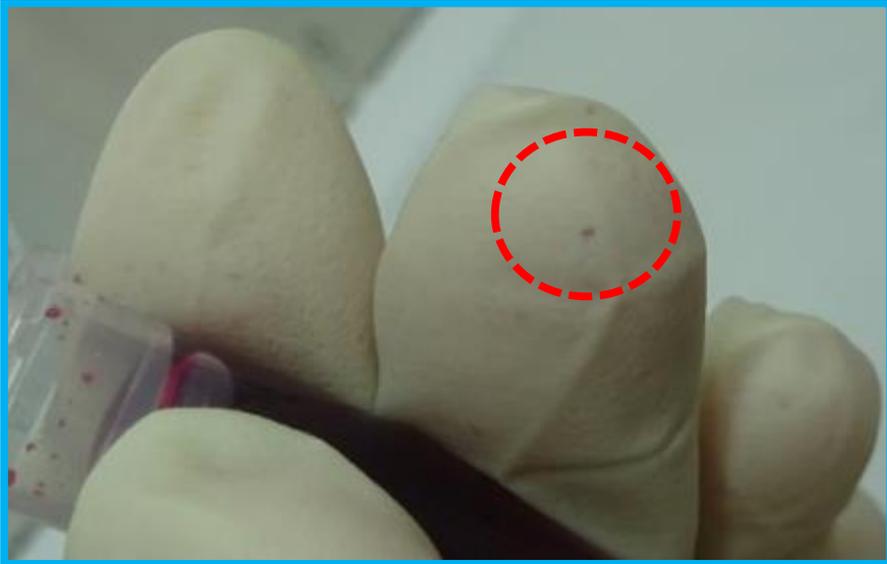
操作(飛沫発生)位置が高いほど、周辺への拡散範囲が広がります。

ファンを稼働させると、細かく軽い飛沫は作業台に落下する前に吸気口へ吸い込まれやすく、作業位置が高いと細かい飛沫はほとんどが吸い込まれます。

ただし、高い位置で発生した、一定の大きさの飛沫は吸気口を超える可能性が出てきます。



# 飛沫による汚染拡大(チューブを持つ手)



右手に持ったマイクロピ  
ペットでプレートに分注する  
際、発生した飛沫により  
チューブを持つ左手が汚染  
されました。

(参考)

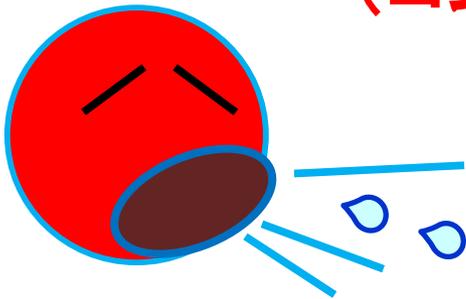
## SARS-CoV-2陽性検体 飛沫に含まれるウイルス量

当所に搬入された鼻咽頭ぬぐい液の中で、ウイルス量の多かった検体では

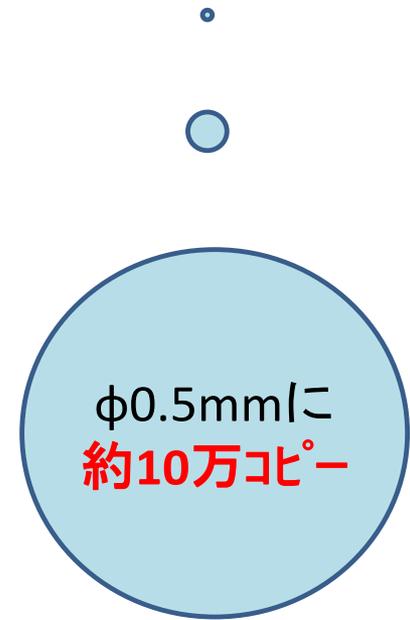
- 飛沫が $\phi 5\mu\text{m}$ のとき(目に見えない大きさ)  
含まれるウイルス量は約0.1コピー
- 飛沫が $\phi 50\mu\text{m}$ のとき(ほぼ目に見えない大きさ)  
含まれるウイルス量は約100コピー
- 飛沫が $\phi 0.5\text{mm}$ のとき(目に見える程度の大きさ)  
含まれるウイルス量は約10万コピー

→ PCR検査の際には飛沫発生厳禁！！

(コンタミのもと)

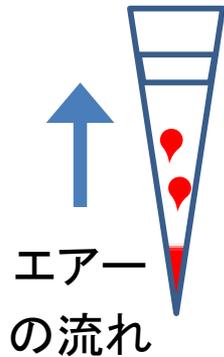


鼻咽頭ぬぐい液は希釈されているため、直接飛沫ならこの約20倍のウイルス量(約200万コピー)になります。



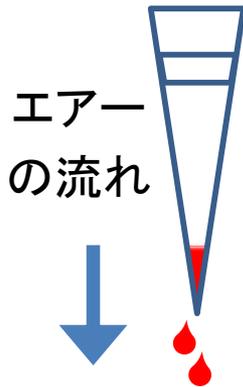
# 飛沫による汚染拡大：マイクロピペットの種類 (チップを外す際の飛沫発生)

## エジェクターボタン付



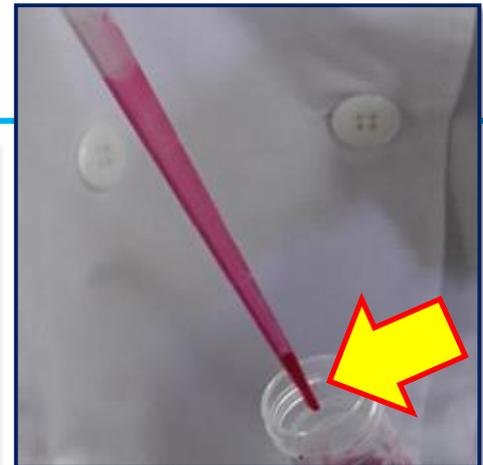
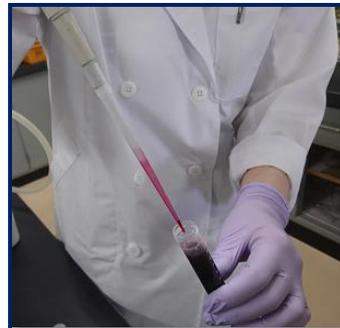
片手で操作する場合、エジェクターボタンでチップを外す際に一度空気をチップ内に吸い込むことになるため、チップの先に残っていた液が飛沫になって本体内部を汚染する可能性があります。

## シングルボタン



チップ内の液を吐き出した後、指を動かさずにそのまま廃棄容器にチップを捨てることが可能ですが、その際にチップの先に残っていた残液が飛沫となって排出されます。

液残りしないチップが理想的



# 器具取扱方法による汚染拡大：マイクロチューブ

## マイクロチューブ



- ・ 通常、マイクロチューブを使用する検査の際、試薬・検体を入れてミキシング後に遠心してからフタを開けて次の操作をします。
- ・ 使用している間に、遠心機のフタに汚れが付くことがあります。

## 遠心機とフタの汚れ



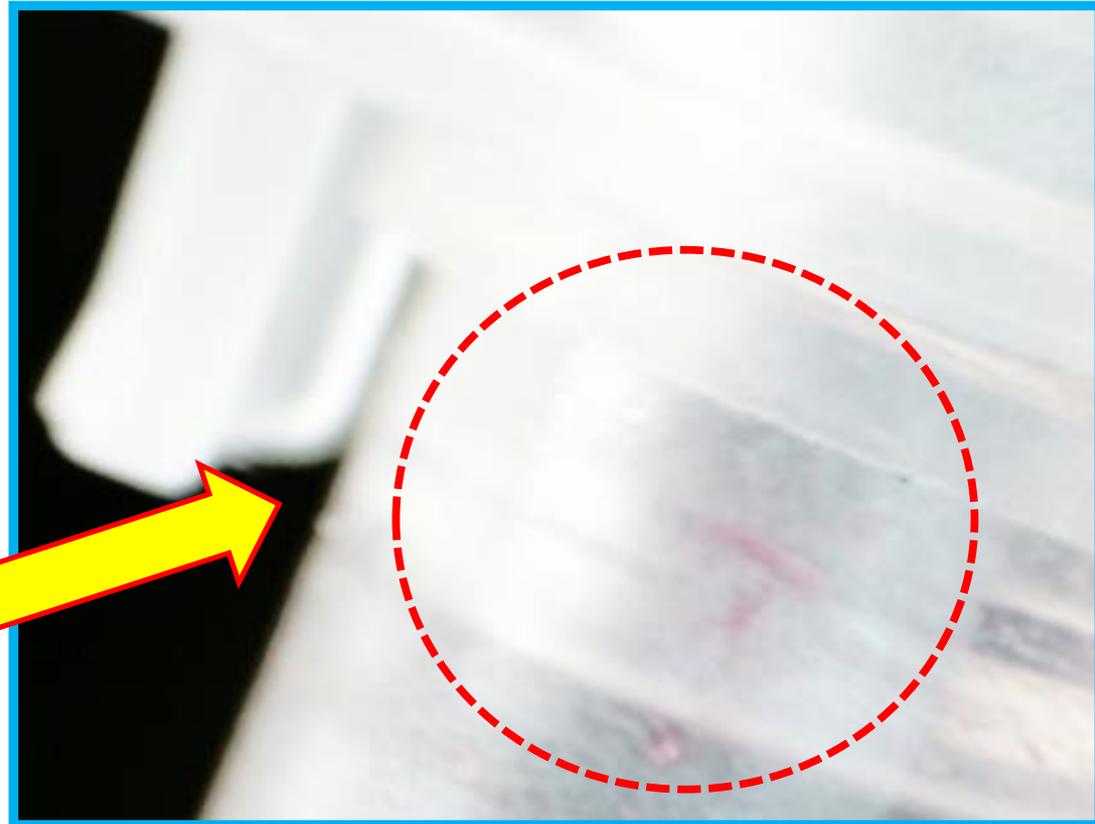
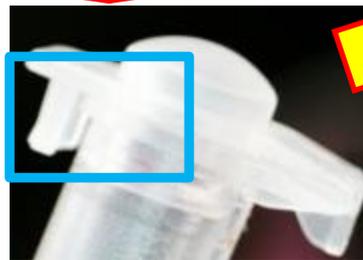
# マイクロチューブからの汚染拡大 (スピンドウンでは落ちない液体)



混和

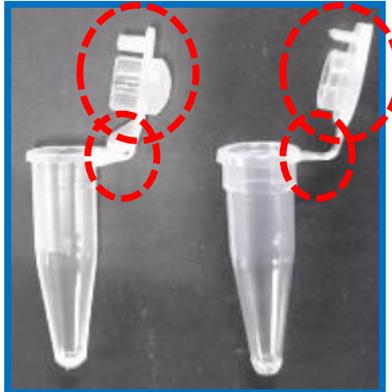


スピンドウン



内ブタとチューブの間に毛細管現象で入り込んだ液体は、スピンドウン(1・5・10・30秒)しても落とし切れませんでした。

# チューブの開閉による汚染



- ・ 内ブタとチューブの間に毛細管現象で入り込んだ液体はフタを開けた際に内ブタの下部(チューブとフタの結合部側)に集まります。
- ・ 再度フタを閉める際、内ブタがチューブの縁に当たることで、チューブとフタの隙間に入り込みます。また、メーカーにより、内ブタの深さや結合部のグラつきが異なり、特に結合部がグラつくほど隙間に入るリスクが上がります。

# マイクロチューブ開閉（オープナー使用）



1.5mLフラット



1.5mLロック付



0.2mLフラット

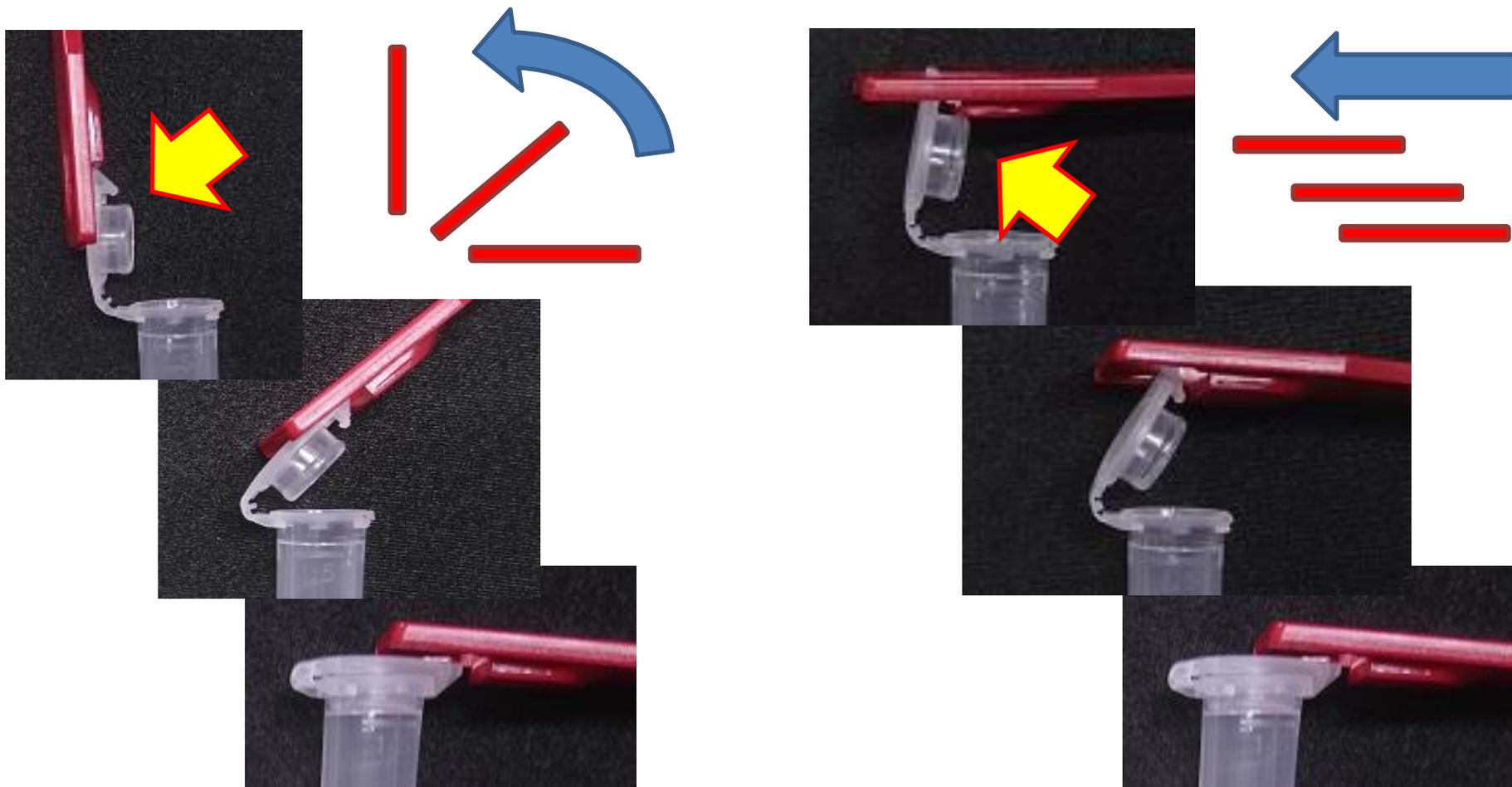


0.2mLシールド付



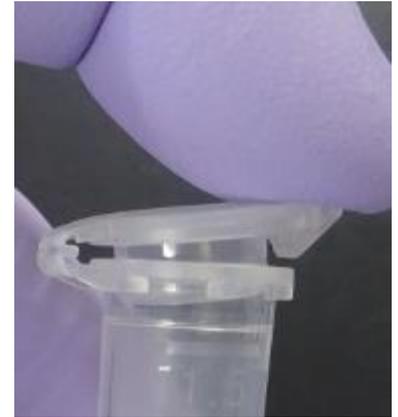
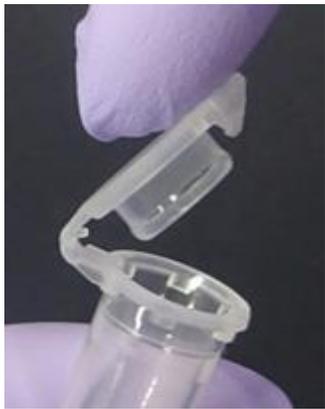
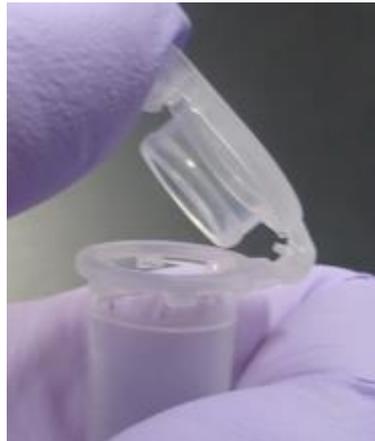
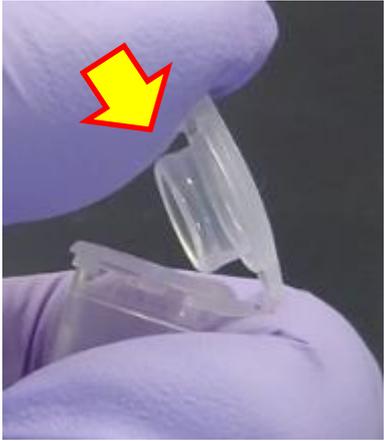
フタにシールドのない0.2mLチューブでは、オープナーの種類に関わらず内ブタにオープナーが接触してしまいました。

# オープナー使用時のフタの開け方



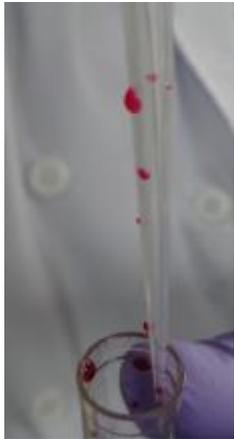
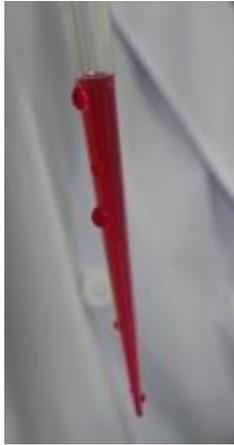
オープナーの動かし方によって、チューブ内蓋にオープナーが触れてしまいます。

# マイクロチューブ開閉（指使用）



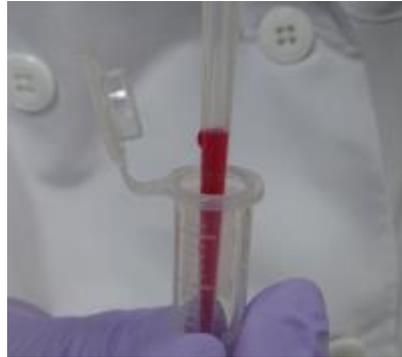
- ・フタを開ける際、ロック等がないと内ボタンに指が触れます。また、ロック等があっても、開ける角度で内ボタンに指が触れてしまいます。
- ・人差し指でフタの先端部分のみを上から押すように閉めれば、内ボタンやフタとチューブの結合部分にも触れずに済みます。

# チップ外側残液からのマイクロチューブ汚染



チューブに液を入れる

チップ外側には残液がある

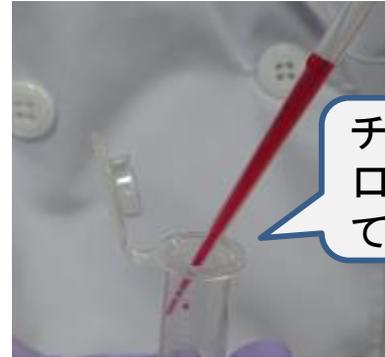


チップを立てれば汚染しない



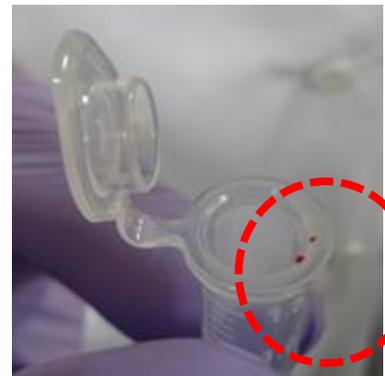
チューブの口に触れてる

チップを寝かせてチューブの口に付けると汚染



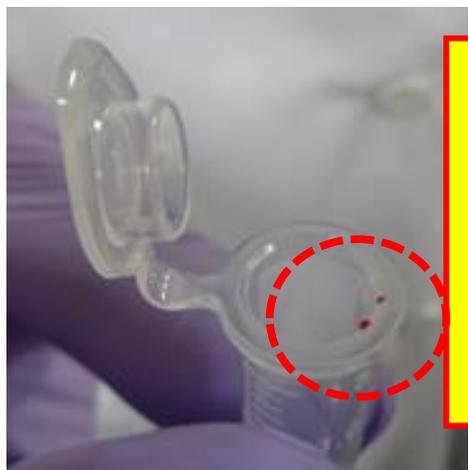
チューブの口に触れていない

チップを寝かせても、チューブの口に付けず、先を内部に入れるなら大丈夫



フタを開ける角度によって、チップを入れる角度も決まる

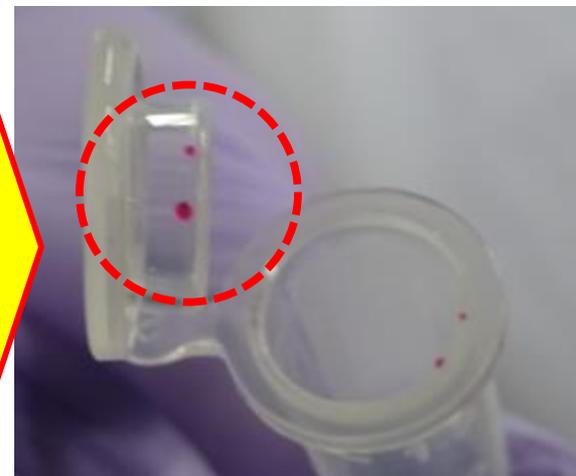
# チップによるチューブの口汚染で、 周辺への汚染拡大の可能性が高まる



フタを閉める



フタを開ける

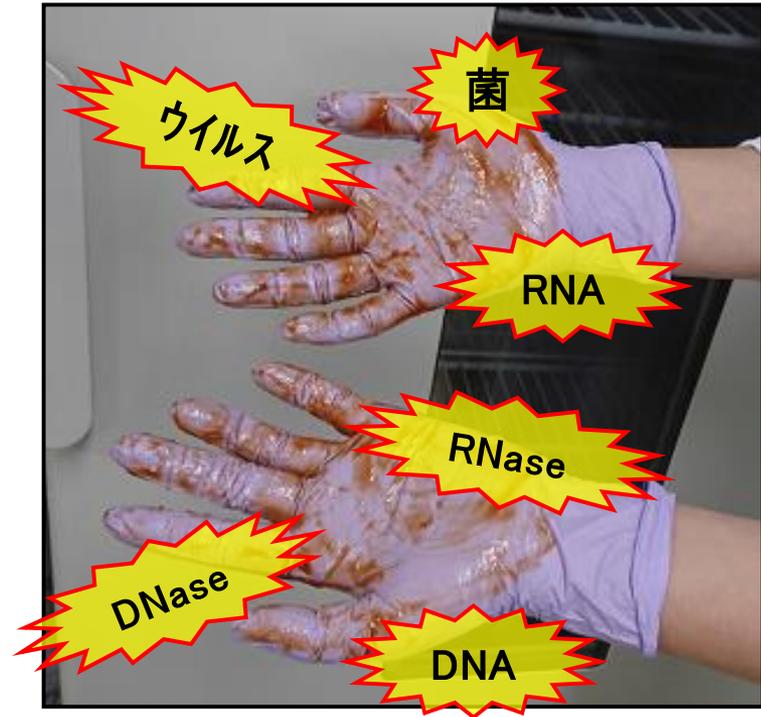


チップを寝かせたことで  
チューブの口に液が付  
着します

フタをしたことで液の付  
着範囲が広がります

内ブタに液付着  
フタの開閉時に指が触れ  
ると周辺への汚染拡大  
の可能性が高まります

# 作業時の手(手袋)の汚れ (DNase、RNase、DNA、RNA等)を可視化



- 手袋の着用時、その後の操作中に、手袋には検査の妨害やコンタミネーションにつながるものが付着します。
- ケチャップを使って、手袋に着用した検査過誤につながるそれらのものをイメージできるようにしてみます。

# 器具取扱方法による汚染拡大：無菌操作



何も考えずに取り出す場合

# 汚れを可視化後に滅菌器具・器材を取扱う

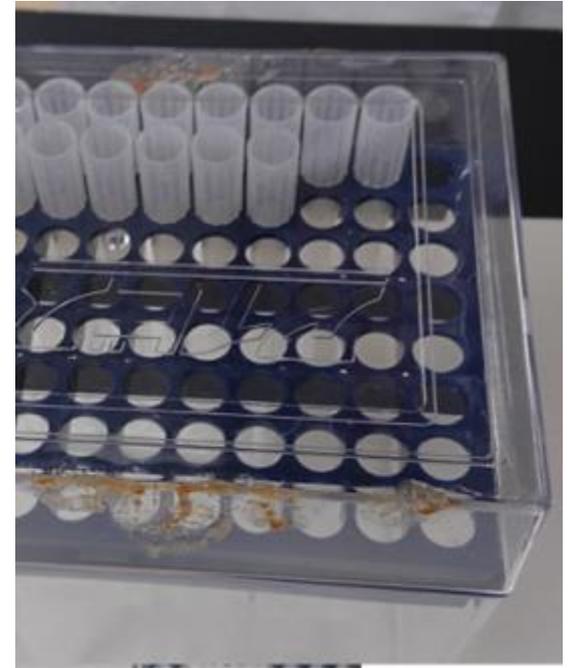


複数の器材が入る容器に手を入れて取り出すと、袋の開口や残りの器材も汚染してしまいます。



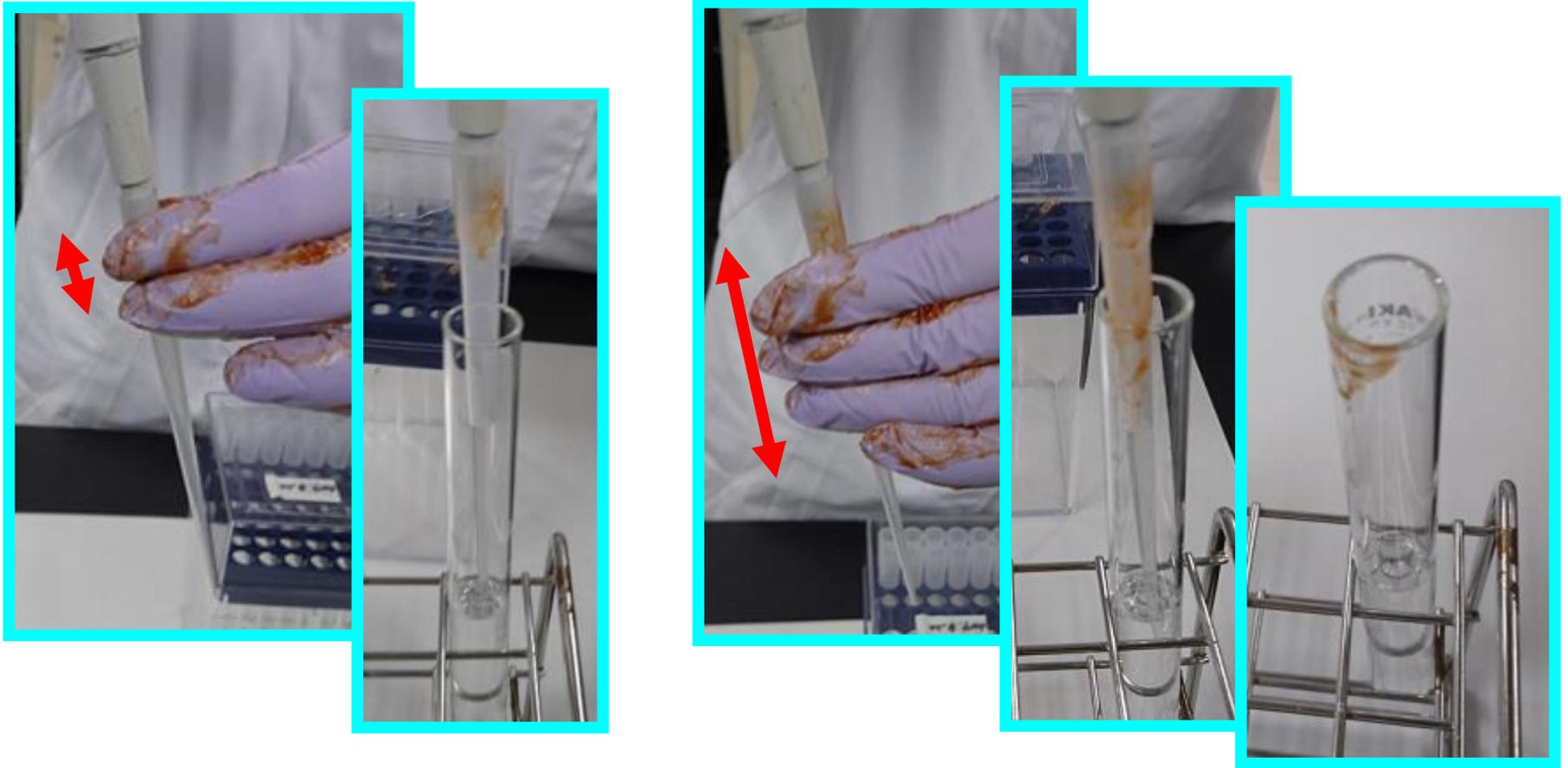
必要分を押し出すなどして取れば、中に残っている器材も綺麗な状態を保てます。

# 手が触れた部分はすべて汚れる



- 手が触れた部分は、検査過誤の元となるものが付着している可能性があります。

# チップを付け直すときに汚染



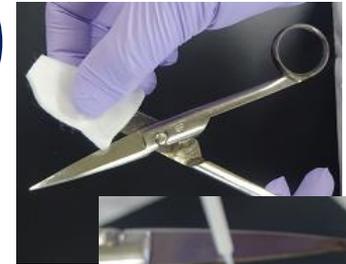
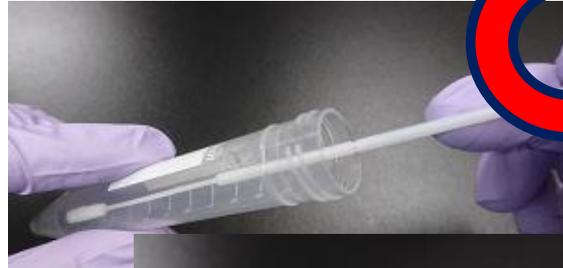
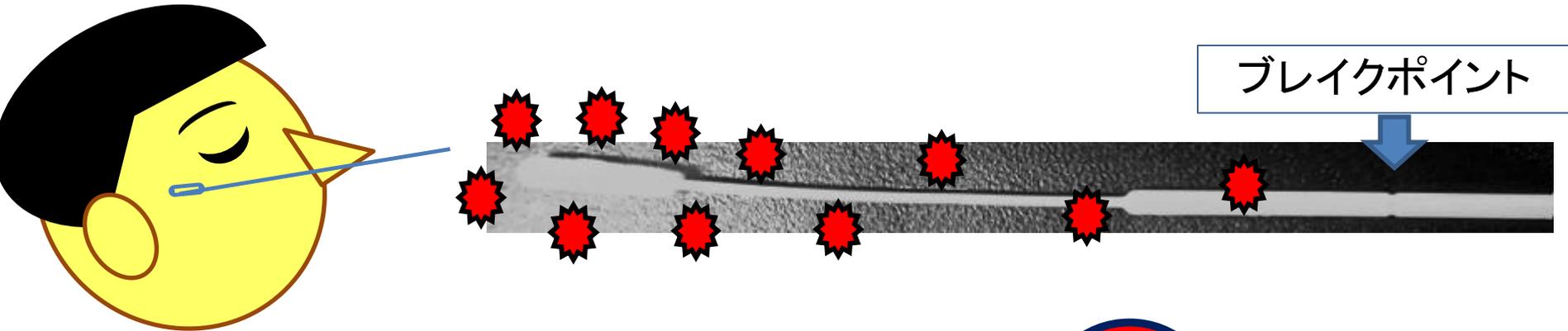
- チップをはめる際、手で付け直すとチップを汚染します。
- チップに触れる範囲が広ければ広いほど、コンタミネーション等のリスクが上昇します。

# 白衣を着用してマイクロプレートへ 検体等を分注する際の注意事項



- 白衣の袖まくりが不十分だったり、紐が出てしまっている場合、作業中にプレートに触れる(入る)可能性があります。
- 袖の紐は切り、袖を肘までまくり上げましょう。  
(作業に集中すると視野が狭くなって気が付かないことがあります。)

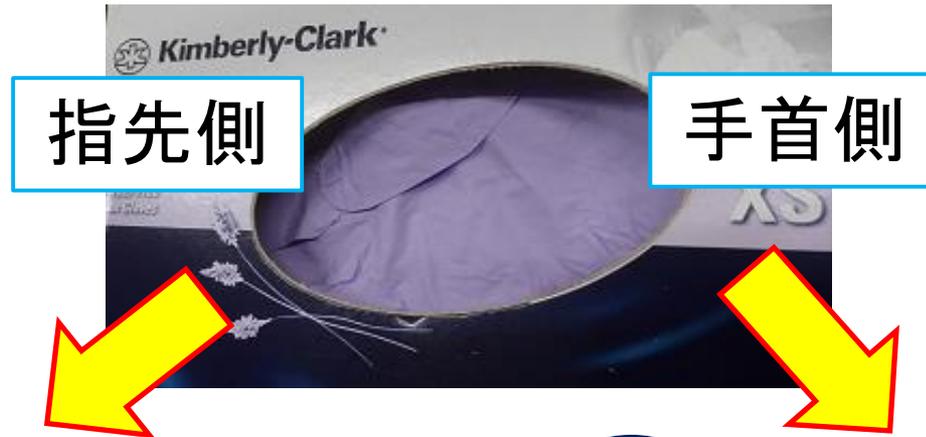
# 鼻咽頭ぬぐい液採取時



感染とコンタミの両方を防止するため、被験者の鼻腔に入れた部分にはウイルスが付いている可能性があることから、絶対に持たないようにしましょう。

# 手袋の取り出し方

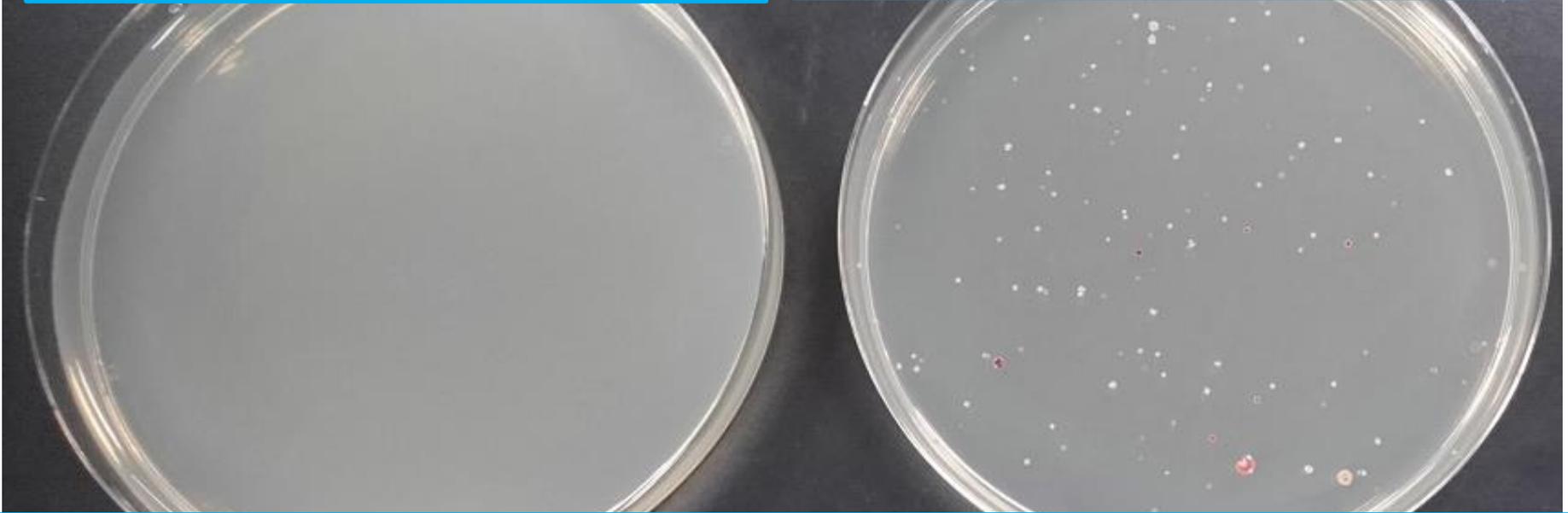
細心の注意を払うのなら、着用の際に手袋の指先を触らないようにしましょう(自分の体液を付けない)。



# 検査者がマスクをする理由

サージカルマスク着用 あり

サージカルマスク着用 なし



口元から約30cmの位置に標準寒天培地(TTC 0.05g/L 加)を置いて  
咳払いを50回したあと 36°C × 48時間培養

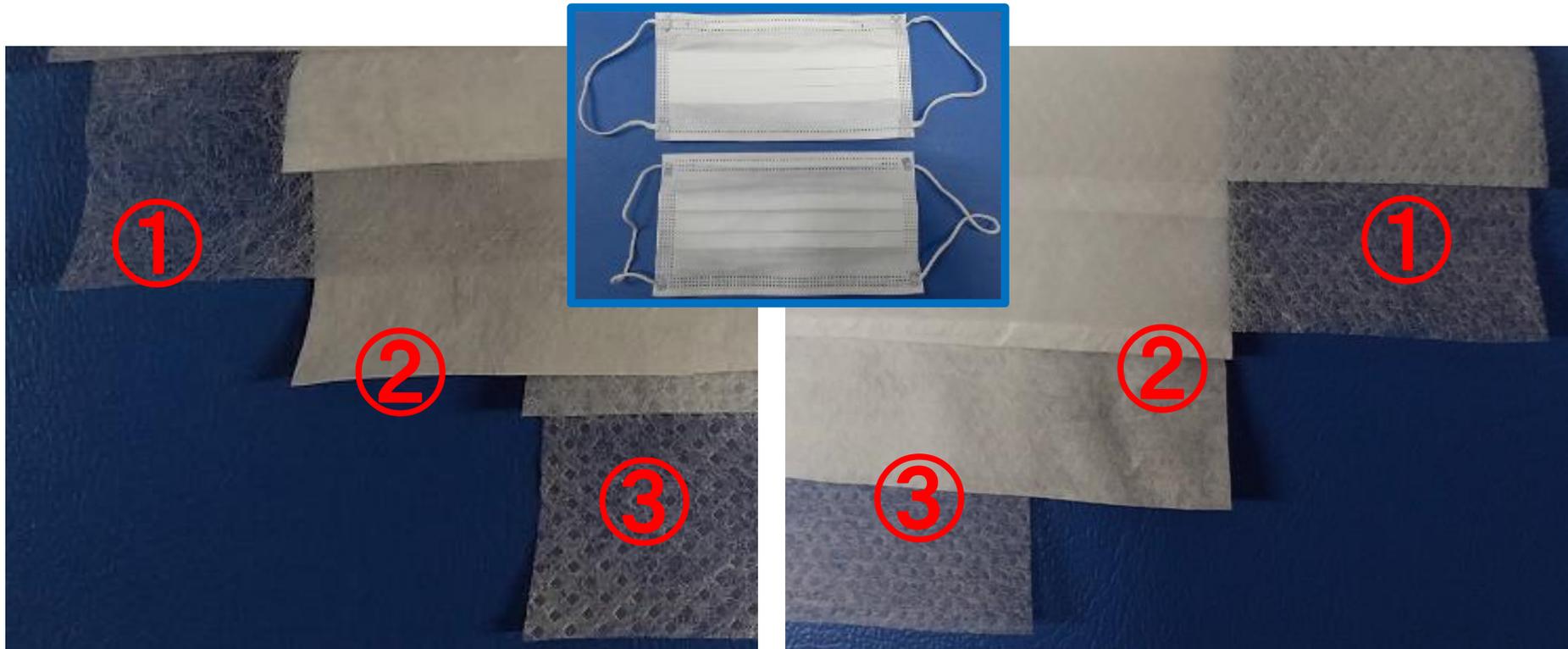
細菌検査では会話・咳払いが原因で、検査者の口腔内細菌(唾液)で検体が汚染されます。

PCRの場合は、口腔内物質由来のDNA・RNAだけでなくDNase・RNaseが検体に入り、偽陽性・偽陰性の原因となる可能性があります。

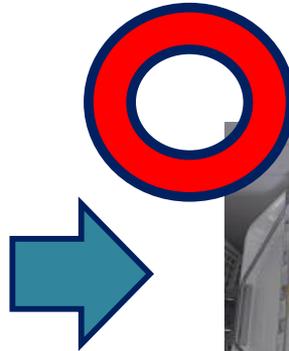
# (参考) サージカルマスク

不織布(主にポリプロピレン)を三層(二層)に重ねてあります。各層に不揃いな小さな穴が開いていますが、重なっているので患者さんに着用してもらおうと飛沫がまっすぐに通り抜けるのを防げます。

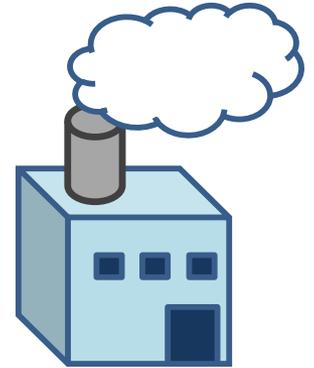
防御する側は、顔にマスクがフィットしていないと顔周りから空気入り込むため、小さな飛沫を一緒に吸い込みやすくなります。



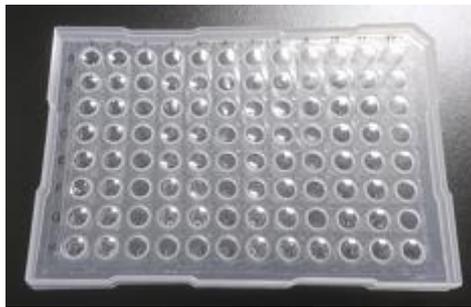
# PCRの増幅産物等が付着した器材の処分



ペール



廃棄物処理場  
で焼却処分



PCR関連廃棄物  
(特に増幅後DNA等)



オートクレーブ



施設内にDNAを  
浮遊させまくるかも

# PPEの着脱

病原体を体内に入れないため、眼・鼻・口に入れないようにするだけでなく、経皮感染等の病原体が含まれていることも考慮し、体に付着させないように脱衣します。

着衣は、脱衣の際に最後まで保護したい部位の装備から始めます。

消毒用アルコールが効かない病原体も多いので、脱衣後は手指消毒だけでなく、泡石けん＋流水で手洗い→ペーパータオルで洗い残しを落とすように拭き取ってください。

検体に含まれるのがSARS-CoV-2  
(呼吸器感染症の病原体)とは  
限らない



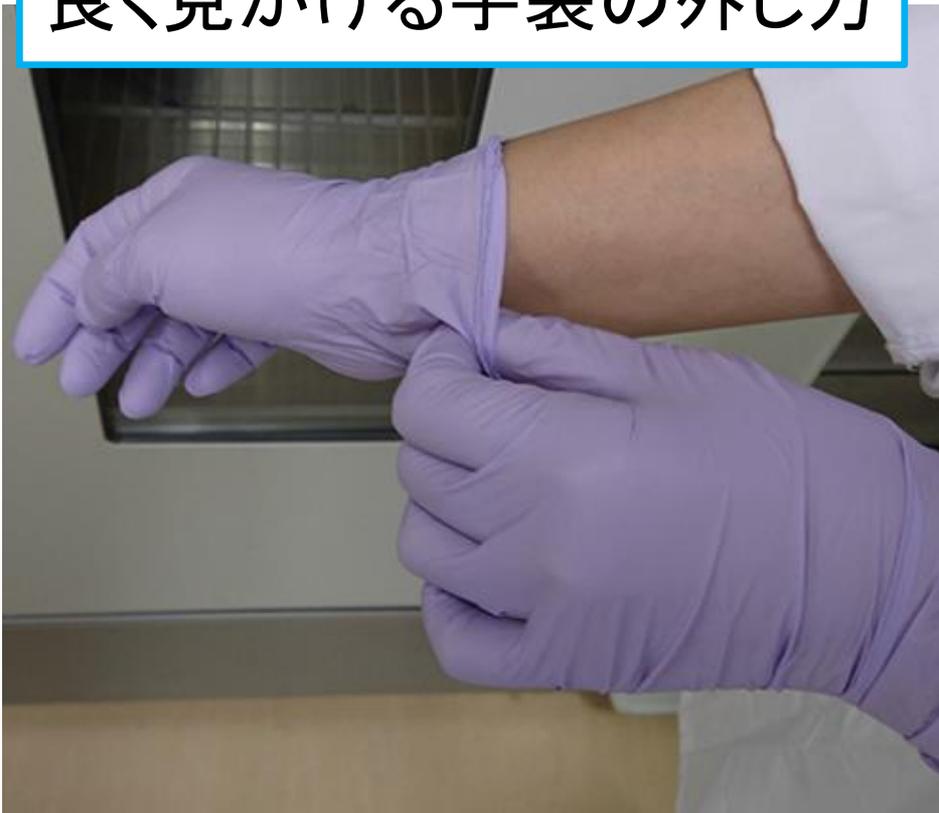
# 感染防護用品(使い捨て手袋)の適切な脱衣等 (作業後の手袋の汚れ・病原体を可視化)



- 最初に手のおいをかぐ。
- 手袋着用後、ケチャップを使って作業後の汚れをイメージできるようにする。

# 汚れが見えるようにした後で手袋を外す

良く見かける手袋の外し方



可視化後



手袋に指を入れて外すのを  
躊躇するのでは？

これが経皮感染を起こす感染症患者検体だったら・・・

# 安全な手袋の外し方(外した手袋の内側を使う)



- 片側の手袋をつまんで、裏返しながら外します。
- 手袋の手首付近が病原体に汚染されている可能性もあるため、外した手袋(内側面)を使ってもう片方の手袋を外します。
- 手からケチャップのにおいがするようなら適切に外せていません。

# 主な消毒薬の抗菌スペクトル

消毒薬	ウイルス		真菌	細菌			消毒対象	
	エンベロープ無 ノロウイルス等	エンベロープ有 インフルエンザウイルス B型肝炎ウイルス等		芽胞菌 炭疽菌 ボツリヌス菌等	結核菌	一般細菌 大腸菌、 緑膿菌等	手指	環境
過酢酸	◎	◎	◎	◎	◎	◎	×	×
グルタール	◎	◎	◎	○	◎	◎	×	×
次亜塩素酸 ナトリウム	◎	◎	○	◎	○	◎	×	○
ポピドン ヨード	◎	◎	◎	×	○	◎	◎	×
消毒用 アルコール	△	◎	◎	×	◎	◎	◎	○
塩酸アルキル ジアルキルエチ ルグリシン	×	×	○	×	○	◎	×	○
塩化ベンザル コニウム	×	×	○	×	×	◎	◎	○

◎:有効(使用可) ○:効果が弱い △:あまり効果がない ×:無効(使用不可)

消毒用アルコールは  
万能ではありません。

→ その呼吸器感染症患者が肺炭疽(炭疽菌)だったら、アルコール消毒では×。  
手に付いたら皮膚炭疽になるかもしれません!! (極論ですが)



# 見えない汚れを、見えるようにする



↑ 手の汚れは、ポンプの上やカランに付いたまま。

# 手洗いの最後まで気を抜かない



丁寧な手洗いと併せてカランも洗う



カランも流す



ペーパータオルで表面に残った汚れを落とすように手を拭く  
(水は流したまま)



ペーパータオルで水を止める



終了

手洗い石けんのポンプの上は汚れたまま  
(前に使った人の汚れがついている。)

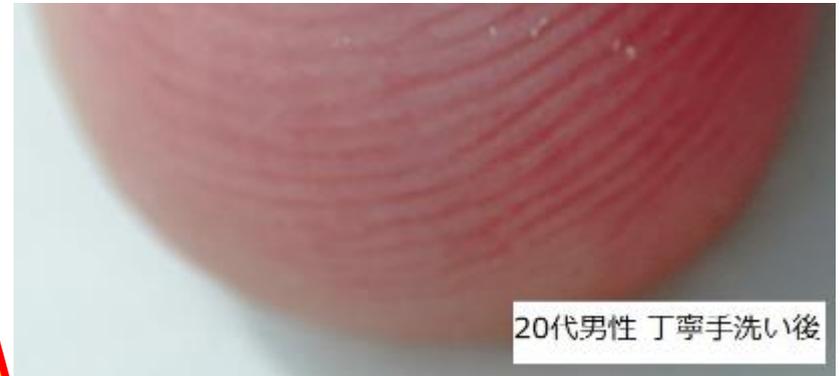
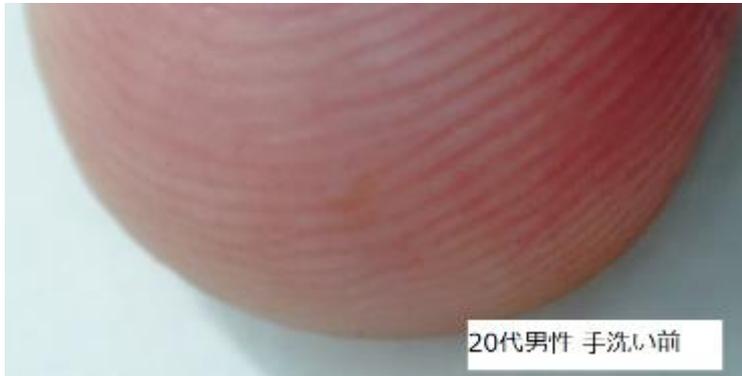
前の人が洗っていないならば、カランにも汚れが付いている。

# 洗い残しが出やすい部分



絆創膏はもちろん、指輪をはめたままでは必ず洗い残しが出ます。  
また、時計を外さなかったり、腕まくりしないまま手洗いすると、手首が洗いにくく、洗い残ししやすくなります。

# 指の表面(手洗い前後)



手洗い後



年代や性別によつての個人差はありますが、手荒れをしている人では手洗いによつて更に手荒れが進み、ヒビ割れた皮膚の隙間に汚れが入り込みやすくなります。また、黄色ブドウ球菌などが繁殖しやすくなります。

# 「液体泡石けんをそのまま擦り込み」と 「水をつけて泡立てて使用」



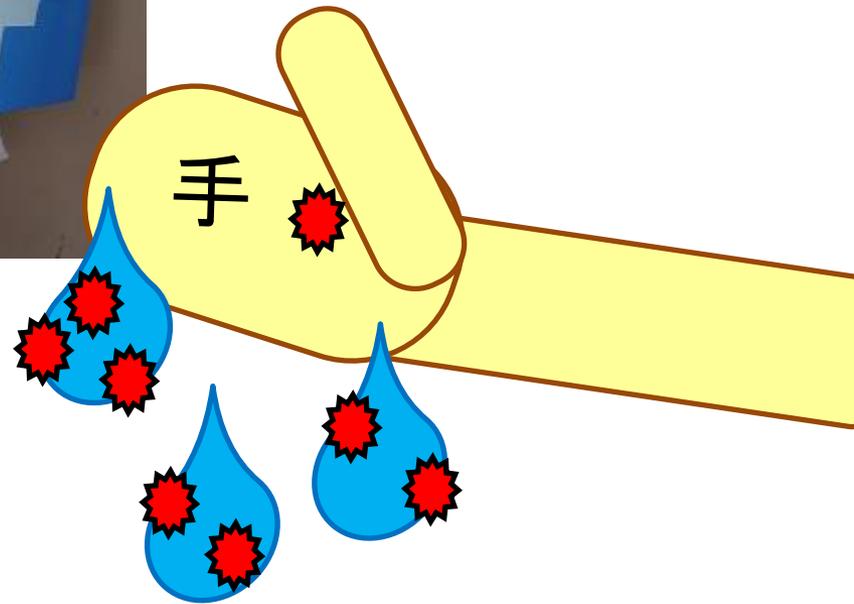
水なしで擦り込み

水をつけて泡立て



同じように液体泡石けんを使用しても、水なしだとすぐに泡が消えてしまい、汚れを落とす効果が減ってしまいます。

# ペーパータオルの置き方



ペーパータオルの置き方によっては、使った人の手の汚れがタオルに染み込んでしまいます。

# 消毒薬の作り置き

希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液(消毒液)を、  
次の条件で保管し、24時間後に残留塩素濃度を  
再測定

残留塩素があれば試薬を入れると反応



- ・密封容器に少量保管
- ・容器内の空気量多

- ・やや蓋を開けた  
容器に少量保管
- ・容器内の空気量多

- ・密封容器に多量保管
- ・容器内の空気量少



# 消毒薬の作り置き・24時間後

もとの濃度の希釈液  
(翌日、同じ希釈  
倍率で調製)

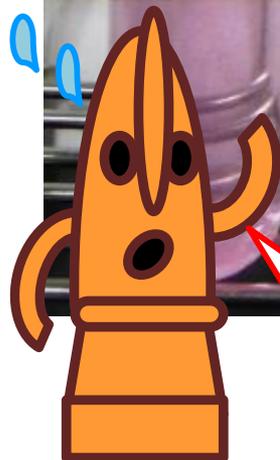
・密封容器に少量保管  
・容器内の空気量多

・やや蓋を開けた  
容器に少量保管  
・容器内の空気量多

・密封容器に多量保管  
・容器内の空気量少



すべて残留塩素が検出されなくなってしまったっ！！  
(ただし、このときの最初の残留塩素濃度は約0.5ppm:プール水程度)



## (参考) 消毒薬の管理



- このとき、写真撮影のために試しに使用した次亜塩素酸ナトリウムは、開封後に冷暗所で保管した、使用期限から3年経過したもの(塩素臭少ない)。
- 表示は6% (60,000ppm)
- 測定時には15ppm程度まで濃度低下  
(1/4,000)



塩素やアルコールのように揮発する消毒薬は、使用期限の確認を行うとともに、使用の都度調製・開封後速やかに使い切るなど、管理の徹底を！！

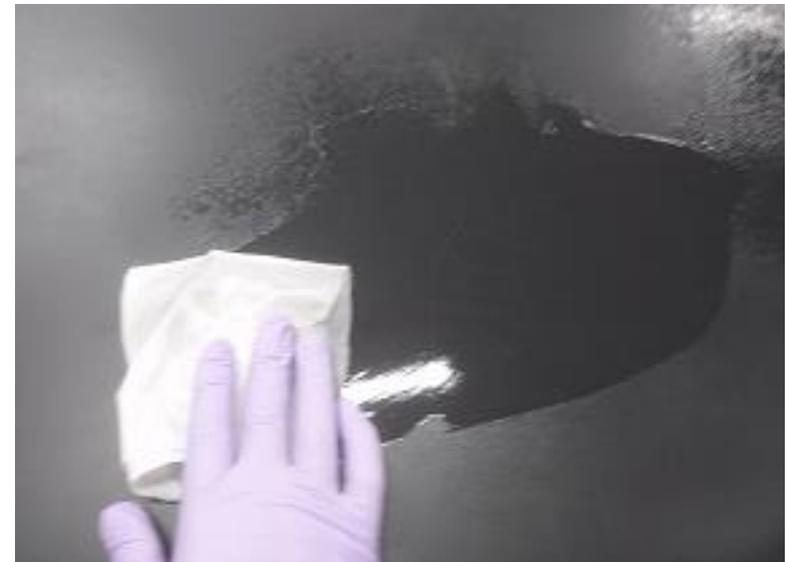


消毒液の残留塩素濃度測定もできます。

# 消毒用アルコールでの環境消毒



噴霧した点状部分のみが消毒されるだけで、液が触れない部分は消毒されません(おまじない程度)。



必ず、消毒場所全体を拭き上げ(拭き取り)しましょう。

# 消毒用アルコールの揮発による濃度低下簡易確認方法の検討

## <使用物品>

- ・ 濃度の異なるアルコール含有液
- ・ ポリ手提げバッグ (PE)
- ・ 角型シャーレ (PS: 栄研)
- ・ ペーパータオル (クレシア)
- ・ マジック (マッキー細字: zebra)

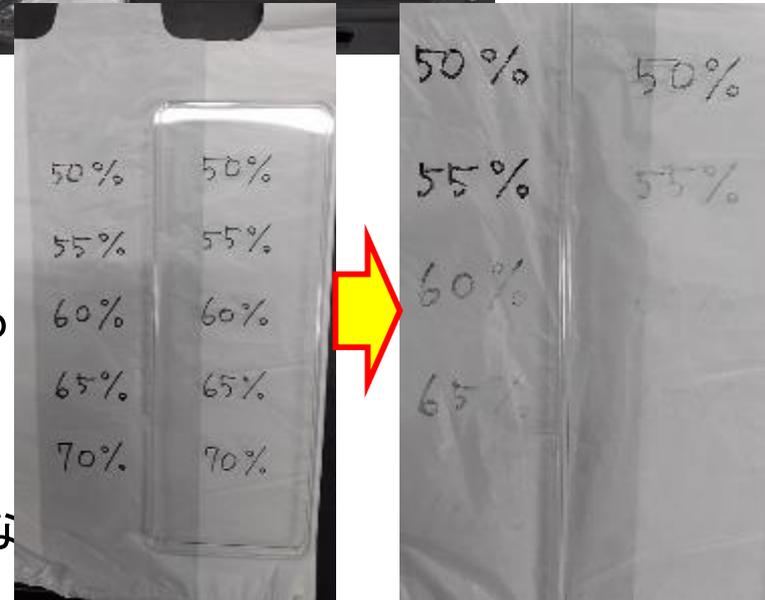


## <確認方法>

- ① PE・PS素材にマジックで文字を記入する。
- ② 各濃度アルコール含有液約3mLをペーパータオルに染み込ませ、10秒間字を消すように擦る (作業者を代えて数回実施)

## <結果>

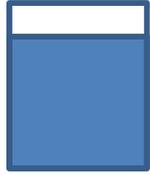
70%ではPS・PE素材ともに字がほとんど読めなくなりましたが、55%程度まで下がると消えなくなりました。



消毒に用いられる70%前後の濃度のアルコールは、油性マジックでポリ袋などに記入した字を消すことができますが、濃度低下によって消せなくなります。

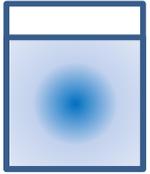
各施設で使用している消毒用アルコールの濃度低下を確認するために、身近にあるものを使い、消毒用アルコール使用開始(開封)時に油性マジックの消え方を調べ、知っておくことで、その後の濃度低下を簡易的に確認できると考えられます。

# (参考) 試薬等を凍結・解凍したとき



凍結前：  
溶解している成分はほぼ均一

凍結融解した試薬や検体はこの状態  
になっているため、必ず混和しましょう。



凍結後：  
・周りから冷却されて水分のみが凍り始める。  
・溶解成分は中心に集められ、最後に凍る。



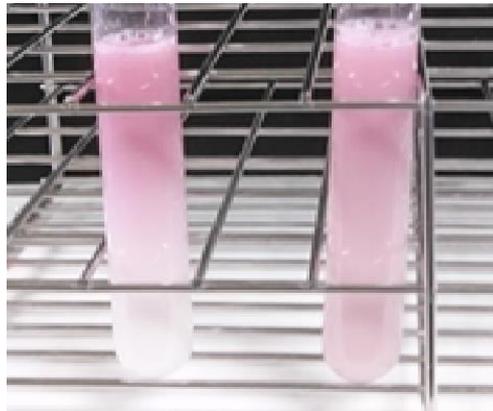
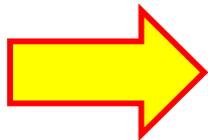
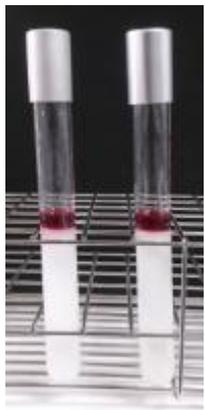
解凍中：  
・溶解成分が多く融点の低い中心が溶ける。  
・周りから温められ、最初に凍った水分が溶け始める。



解凍後：  
・溶解成分が多いほど比重が重いため、底に沈む。  
・最初に凍った水分は比重が軽いため、上部に集まる。

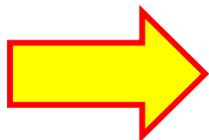


# (参考)ミキシング方法による混和状態の違い

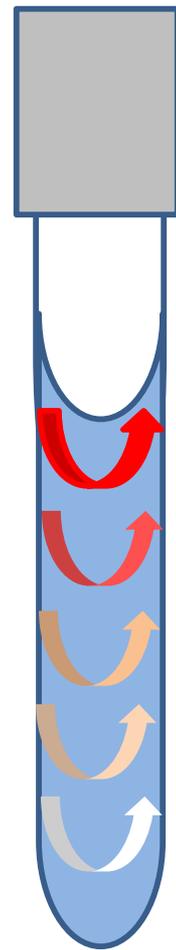


ミキサーに押し当て  
てたまま3秒1回

ミキサーに1秒押し  
当てて離すを3回



ミキサーに押し当て  
たままだと水流が一定  
になり、液体は同じ高  
さ周辺で回転するため  
混ざりにくい



# PCR検査の基本動作確認(実習)

各操作における飛沫などのコンタミ原因発生機序と防止対策

飛沫・コンタミ発生機序の確認

→ わざと飛沫や汚染を拡大させてみましょう

↓ ↑

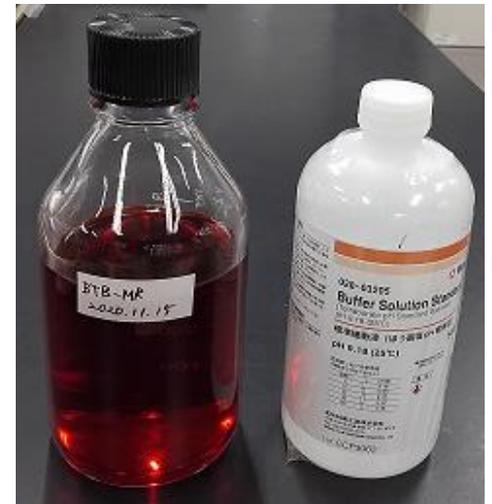
飛沫や汚染を防ぐ操作方法を考えましょう

# 使用する主な試薬・器材等

- BTB-MR試薬（自家調製）

メチルレッド	0.1g
ブロムチモールブルー	0.2g
95%エタノール	300mL
D.W.	200mL

- 標準緩衝液 (pH9.18)
- グラム染色液 (フクシン)
- ケチャップ
- PCR検査用器材



# マイクロチューブ・チップの取り扱い・ 定量分注していることの確認方法(例)

- BTB-MR試薬を8連の0.2mLチューブに各20 $\mu$ Lずつ分注する。
- フタをして、チューブの口に液が付いていないか確認する。
- スピンダウンして液面が揃っていることを確認する。
- フタの内側に触れないように1本ずつフタを開閉し、最初の4本に標準緩衝液(pH9.18)を各1 $\mu$ L、残りの4本に各2 $\mu$ Lを入れる(場合によっては1.5 $\mu$ L)。
- 転倒混和し、同じ量の標準緩衝液を入れたチューブ内の液の色が揃うことを確認する。

