

新型コロナウイルスにおけるリアルタイム PCR 検査, 変異株スクリーニング検査及びゲノム解析結果

江原勇登 篠原美千代 鈴木典子 小川泰卓* 大崎哲 青沼えり 宮下広大 内田和江

Results of Real-time PCR test, variant screening test and genome analysis for SARS-CoV-2

Hayato Ehara, Michiyo Shinohara, Noriko Suzuki, Yasutaka Ogawa,
Satoshi Daisaki, Eri Aonuma, Kodai Miyashita, Kazue Uchida

はじめに

2020年に中華人民共和国（中国）武漢市を中心に広がった新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2020年1月16日にわが国で初めて患者が確認され、同年1月28日に感染症法に基づく指定感染症¹⁾に指定され、診断した医師は直ちに管轄の保健所に届け出ることが義務づけられた。当所では1月31日に新型コロナウイルス感染の疑われる患者検体が搬入され、2月10日に1症例からリアルタイム PCR 検査により新型コロナウイルス遺伝子を検出し、県内で初めての症例が確認された²⁾。

また、12月には英国では変異株（VUI-202012/01）による新型コロナウイルス感染症患者の急速な増加に直面し³⁾、日本国内でも変異株による感染拡大が懸念されたことから、変異株感染者の早期検知を目的として変異株スクリーニング検査に関する通知⁴⁾が発出された。当所ではリアルタイム PCR 検査で陽性になった検体のうち、Ct 値が30以下となった検体を検査対象とし、2021年1月25日から N501Y 変異をターゲットにした変異株スクリーニング検査を開始した。

さらに、国立感染症研究所の依頼に基づき、リアルタイム PCR 検査陽性と判定された一部の検体の抽出 RNA を国立感染症研究所に送付し、ゲノム解析を開始した。

当所においては、2020年11月に国立感染症研究所主催の次世代シーケンサー（NGS）技術研修に参加し、ゲノム解析専用 NGS として iSeq（Illumina）を2021年3月に導入し、ゲノム解析を行う体制を整えたことから、2021年3月16日から陽性検体のゲノム解析を開始した。

新型コロナウイルスにおける陽性率、変異株の種類については、対象とする検体や地域、採取時期により大きく異なり、広域的な感染防止措置や日常的な感染防止対策に活用するためにも、県内の発生の動向や推移を把握しておくことは非常に重要である。これらのことから本調査では、2020年度に県内で新型コロナウイルスを疑う症状を発症した患者検体における陽性率及び変異株の種類についてその推移をまとめたので報告する。

材料及び方法

1 リアルタイム PCR 検査

2020年4月から2021年3月までに、さいたま市及び中核市を除く県内で新型コロナウイルス感染症が疑われて搬入された患者の臨床検体34,934件（咽頭ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液等）をウイルス検査の材料とした。臨床検体から QIAamp Viral RNA mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型にし、病原体検出マニュアル⁵⁾に準じてリアルタイム PCR により検査を行った。

2 変異株スクリーニング検査

2021年1月25日以降にリアルタイム PCR 検査で陽性になった検体のうち、Ct 値が30以下となった347検体を検査対象とした。検体から抽出した RNA を鋳型にし、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit（タカラバイオ）によりリアルタイム RT-PCR を行った。PCR 反応条件及び N501Y 変異検出用のプライマーおよびプローブは N501Y 変異検出マニュアル⁶⁾に従い検査を実施した。

3 ゲノム解析

2021年3月15日までにリアルタイム PCR 検査で陽性になった検体のうち、Ct 値が30以下となった1,031検体については、国立感染症研究所でゲノム解析を実施した。なお、2021年3月16日以降にゲノム解析の対象となった149検体については、当所でゲノム解析を行った。抽出 RNA を LunaScript RT SuperMix Kit（NEB）を用い逆転写し、QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN）によりライブラリーを調整した。AMPureXP（BeckmanCoulter）で精製後、MiSeq（Illumina）あるいは iSeq を使用しペアエンドシーケンスを行いデータを取得した。得られたデータは国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの web アプリケーション⁷⁾によりゲノム配列及び Pangolin（COVID-19 Lineage Assigner Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages）系統⁸⁾を得た。

* 現 狭山保健所

結果

1 リアルタイム PCR 検査

2020年4月1日から2021年3月31日までの新型コロナウイルス検出状況を図1に示した。34,934検体中、2,299検体(6.6%)から新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)が検出された。陽性率は4月が13.7%で最も高く、5月に2.1%に下がったものの、2月まで上昇傾向が見られた(図1)。

2 変異株スクリーニング検査

347検体中37検体(10.7%)からN501Y変異株が検出された(表1)。N501Y変異株数は2月が19検体(検査対象161検体)と最も多く、陽性率は1月が16.9%と最も高かった。

表1 変異株スクリーニング検査の状況

	1月	2月	3月	合計
検体数	65	161	121	347
陽性(501Y)	11	19	7	37
陰性(501N)	53	139	111	303
判定不能	1	3	3	7
陽性率(%)	16.9	11.8	5.8	10.7

3 ゲノム解析

1,180検体のうち、発症日の判明している846検体のゲノム解析ができ、27種のPangolin系統に分類された。国立感染症研究所で定めている懸念される変異株(VOC)⁹⁾についてはB.1.1.7系統(アルファ株)が21検体、B.1.351系統(ベータ株)が1検体、P.1系統(ガンマ株)が11検体検出された。また、注目すべき変異株(VOI)に位置付けられていたR.1系統が59検体検出された。1週間ごとのゲノム解析結果を図2に示した。

4月から5月ではB.1.1系統が大半を占めた。7月から9月にかけては、B.1.1.284系統が主流ではあるものの、8月になるとB.1.1.214系統が増えていった。11月から1月にかけては、主流がB.1.1.214系統になった。

2021年1月からR.1系統が検出され、3月には8割程度まで増え主流系統になった。

考察

全国的に第1波、第2波、第3波といわれる大きな流行が見られる中、当所にも多数の新型コロナウイルス疑い検体が搬入された。国立感染症研究所の報告¹⁰⁾では、3月中旬からの流行を第1波、7~9月の流行を第2波、10月以降の流行を第3波と定義している。当所のリアルタイムPCR検体数は第1波では4月、第2波では8月、第3波では12月にピークがあり、全国的にも同様の傾向が見られた¹¹⁾。

また、当所のN501Y変異株スクリーニング検査の結果は1月が最も陽性率が高かったが、全国的には1月から3月にかけてN501Y変異株の占める割合が増加する傾向が見られ、結果が異なっていた。県内の検査は当所のほか医療機関、

民間検査機関、さいたま市、中核市で実施されている。当所の検体は全体のごく一部であり、クラスターや変異株の疑いが強い等、行政的に重要度が高い検体が搬入される傾向があるため、国内におけるN501Y変異株の市中感染報告例がまだ少なかった1月に、県内のN501Y変異株の流行をとらえることができたと推察された。

さらに、国内で流行しているウイルスの系統の推移を明らかにするため、国立感染症研究所や他自治体との連携のもと、県内で検出されたウイルスの全ゲノム解析を実施した。4月から12月の各流行の波における系統の割合は、全国と同様の傾向であった¹²⁾。一方で、1月から3月に認められたR.1系統の増加は、関東地方及び東北地方独特の傾向であり、当所の結果は同様であった¹²⁾。なお、関西地方では1月から3月にアルファ株が増加していた¹²⁾。ゲノム解析により得られた全ゲノムデータは国際的データベースであるGISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)¹³⁾に登録され、今後、不特定の研究者による活用が可能となった。

ワクチン接種が始まり、国民全体にいきわたるまで今後も新型コロナウイルス感染症への対応が必要になると考えられる。また、ワクチン接種が進むと免疫を回避する新たな変異株が出現することが予測される。新たな変異株の出現に迅速に探知対応し、変異株感染拡大抑止に繋がるよう情報の収集や技術の研鑽に日ごろから努める必要があると考える。

文献

- 1) 新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令 令和2年1月28日号外政令第11号
- 2) 埼玉県保健医療部保健医療政策課:新型コロナウイルスに関連した患者の発生について
<https://www.pref.saitama.lg.jp/a0001/news/page/2019/0211-01.html> (2021年9月7日現在)
- 3) 国立感染症研究所:英国における新規変異株(VUI-202012/01)の検出について(第1報)2020年12月22日
- 4) 厚生労働省:新型コロナウイルス感染症の積極的疫学調査における検体提出等について(要請) 健感発0205第4号 令和3年2月5日
- 5) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル 2019-nCoV 令和2年2月5日
- 6) 国立感染症研究所:リアルタイム one-step RT-PCR法によるSARS-CoV-2 Spike N501Y変異の検出 令和3年2月19日
- 7) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター:ARTIC(N2)法によるSARS-CoV-2ゲノム解析のためのWebアプリケーション第3版 2021年4月16日
- 8) PANGO Lineages,
https://cov-lineages.org/lineage_list.html (2021年9月7日現在)

- 9) 国立感染症研究所：感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の新規変異株について（第11報） 2021年7月17日
- 10) 国立感染症研究所：新型コロナウイルス SARS-CoV-2 ゲノム情報による分子疫学調査 2021年1月14日
- 11) 厚生労働省：国内の発生状況など
<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/kokunainohasseijoukyou.html>（2021年9月7日現在）
- 12) Tsuyoshi Sekizuka, Kentaro Itokawa, Masanori Hashino et al. : A discernable increase in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 R.1 lineage carrying an E484K spike protein mutation in Japan. Infection, Genetics and Evolution, 94(8), Article 105013, 2021
- 13) GISAID, <https://www.gisaid.org/>（2021年9月7日現在）

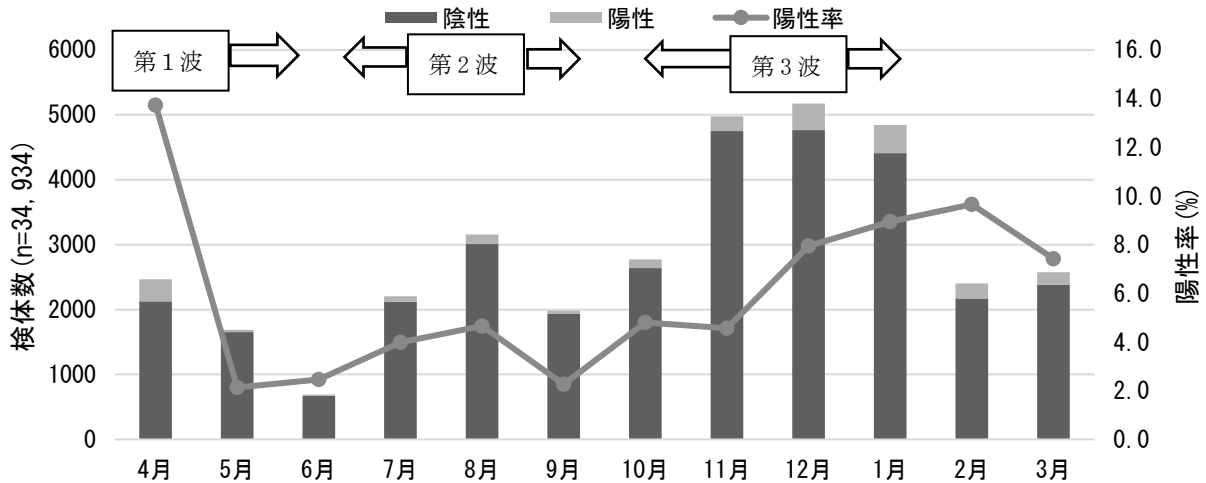


図1 新型コロナウイルスにおけるリアルタイムPCR検査の状況（検体採取月）

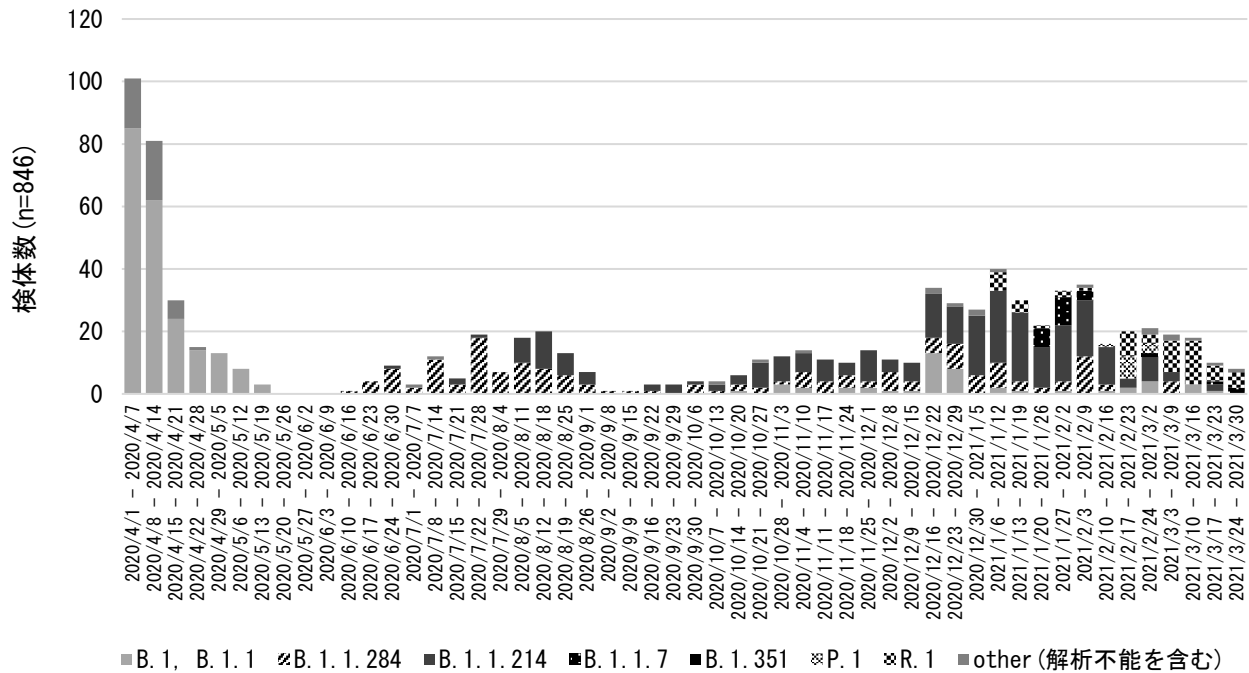


図2 ゲノム解析結果（発症日）