

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 (2022年4月～2023年3月)

江原勇登 富岡恭子 濱本紀子 大崎哲*1 宮下広大*2 牧野由幸 黒沢博基 川島都司樹 今泉晴喜 内田和江

Results of Real-time PCR test, variant screening test and genome analysis for SARS-CoV-2
(April 2022–March 2023)

Hayato Ehara, Kyoko Tomioka, Noriko Hamamoto, Satoshi Daisaki, Kodai Miyashita, Yoshiyuki Makino,
Hiroki Kurosawa, Toshiki Kawashima, Haruki Imaizumi, 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は、新たな変異株の出現に伴い大きな流行の波を繰り返し引き起こし、2022年度も未だ収束していない。これまでで最も感染力の高い変異株である B.1.1.529 系統(オミクロン株)が2022年度当初も流行していた。

一方で当所に搬入される新型コロナウイルス疑い検体の搬入は民間検査機関の充実、保健所の業務負担軽減のため積極的疫学調査を取りやめたことにより減少傾向にあったが、変異株による新たな感染者の波の発生が懸念されていたことから、変異株感染者の早期探知を目的とする変異株スクリーニング検査や、変異株を確定するゲノム解析を継続する必要性があった。そこで2022年4月から県内の医療機関からの新型コロナウイルス陽性検体を受け入れるとともに、民間検査機関と委託契約を結びゲノムデータを入手した。

変異株スクリーニング検査は2021年11月には L452R 変異のない B.1.1.529 系統(オミクロン株)を検出するための L452R 変異株スクリーニング検査、2022年3月には T547K 変異のない BA.2 系統(オミクロン株)を検出するため T547K 変異株スクリーニングを開始したが、時間が経過するとともにオミクロン株の変異が進み、変異株スクリーニングによる系統の区別が困難になってきたため2022年8月12日に終了した。

ゲノム解析については全ゲノムの変異箇所の特定、系統の判別に有用な検査手法であることから、新たな検査担当者に技術を継承し、2台の次世代シーケンサー(MiSeq, iSeq (Illumina))を駆使し引き続き実施した。

新型コロナウイルスにおける陽性率、変異株の流行状況は、対象とする地域、時期により大きく異なるため、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することは非常に重

要である。そこで、本調査では、前述の経緯のもと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のリアルタイム PCR 検査、変異株スクリーニング検査、ゲノム解析による主流系統の推移をまとめたので報告する。なお、2020年度の検査状況については、埼玉県衛生研究所報第55号¹⁾、2021年度の検査状況については、埼玉県衛生研究所報第56号²⁾にて報告しているところであるが、L452R 及び T547K 変異株スクリーニング検査は2021年度及び2022年度をとおして実施していること、新型コロナウイルスの流行の波と変異株の発生状況の関係を説明するためには、2022年度以前の結果が重要であることから、本稿においては、変異株スクリーニング検査は2021年度及び2022年度について、ゲノム解析は2022年度までの全ての検査結果を含めた。

材料及び方法

1 リアルタイム PCR 検査

2022年4月から2023年3月までに、新型コロナウイルス感染症が疑われて当所に搬入された患者の臨床検体2,559件(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、唾液)をウイルス検査の材料とした。リアルタイム PCR 検査は、SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット(タカラバイオ)を用いて、添付の取扱説明書³⁾に従い実施した。

2 変異株スクリーニング検査

当所のリアルタイム PCR 検査で陽性になった検体、ホテル療養者の検体、民間検査機関で陽性になった検体、県内3つの医療機関で陽性になった検体で、当所のリアルタイム PCR 検査で Ct 値が30以下となった合計1,625検体を検査対象とした。

2021年11月29日から L452R 変異株スクリーニング検査、2022年3月11日からは T547K 変異株スクリーニング検査を開始した。これらの変異株スクリーニング検査は2022年8月12日に終了した。検体から抽出した RNA を鋳型にし、

*1 現 薬務課 *2 現 食肉衛生検査センター

QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN) によりリアルタイム RT-PCR を行った. PCR 反応条件及びプライマーおよびプローブは検出マニュアル^{4) 5)} に従った.

3 ゲノム解析

変異株スクリーニング検査対象検体について, ゲノム解析を行った. 抽出RNAをLunaScript RT SuperMix Kit(NEB) を用い逆転写した後, Q5 (NEB) を用いたマルチプレックス PCR を行い, 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 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⁶⁾ によりゲノム配列及び Pangolin (COVID-19 Lineage Assigner Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINeages) 系統⁷⁾ を得た. この結果に加え, さいたま市, 川越市, 越谷市, 川口市におけるゲノム解析実施検体, 民間検査機関(BML)において実施したシーケンス結果を当所でゲノム解析した検体を加えた合計9,744検体について, 発症日を元に1週間ごとの Pangolin 系統別検体数を集計した.

結果

1 リアルタイム PCR 検査

2022年4月から2023年3月までの採取月ごとの新型コロナウイルス検出状況を表1に示した.

2,559検体中384検体が新型コロナウイルス陽性であった. 月別に見ると, 検体数は2022年7月が891検体(うち陽性は172検体)と最多であった. 2022年12月以降は検体の搬入がなかった.

2 変異株スクリーニング検査

変異株スクリーニング検査の検査状況を表2,3に示した. 変異株スクリーニング検査は2021年度及び2022年度をとおして実施していることから, 2021年度の結果も示した.

表1 リアルタイムPCR検査の状況 (n=2,559)

	2022年4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2023年1月	2月	3月	計
検体数	606	597	80	891	309	48	17	11	—	—	—	—	2,559
陽性数	44	107	5	172	51	0	2	3	—	—	—	—	384
陽性率(%)	7.3	17.9	6.3	19.3	16.5	0.0	11.8	27.3	—	—	—	—	15.0

表2 オミクロン株を検出するL452R変異株スクリーニング検査(n=1,624)

	2021年12月	2022年1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
検体数	82	516	125	55	454	61	36	163	132	1624
陽性(452L)	3	438	124	54	453	61	30	25	7	1195
陰性(452R)	57	49	0	0	0	0	5	129	122	362
判定不能	22	29	1	1	1	0	1	9	3	67
陽性率	3.7	84.9	99.2	98.2	99.8	100	83.3	15.3	5.3	73.6

表3 オミクロン株BA.2系統を検出するT547K変異株スクリーニング検査(n=883)

	2022年3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
検体数	37	454	61	36	163	132	883
陽性(547T)	16	337	57	35	163	132	740
陰性(547K)	21	116	4	0	0	0	141
判定不能	0	1	0	1	0	0	2
陽性率	43.2	74.2	93.4	97.2	100	100	83.8

(1) オミクロン株を検出する L452R 変異株スクリーニング検査

B. 1. 1. 529系統 (オミクロン株) を検出する L452R 変異株スクリーニング検査の判定月ごとの結果を表2に示した. 1,624検体を検査し1,195検体 (73.6%) が陽性 (452L) であった. 2021年12月の陽性率は3.7%であり, 1月には84.9%と上昇し, 2月には判定不能を除き全て陽性であった. 6月になると L452R 変異を持つ BA. 5系統 (オミクロン株) が検出され, 急速に増加したことから, 8月には陽性率が5.3%に低下した. なお, 判定不能であった67検体のうち6検体については, ゲノム解析の結果, L452Q 変異を持つ BA. 2. 12. 1系統であった.

(2) オミクロン株 BA.2系統を検出する T547K 変異株スクリーニング検査

BA. 2系統 (オミクロン株) を検出する T547K 変異株スクリーニング検査の判定月ごとの結果を表3に示した. 883検体を検査し740検体 (83.8%) が陽性 (547T) であった. 経時的に陽性率が増加し, 6月には判定不能を除き全て陽性であった.

3 ゲノム解析

ゲノム解析を実施した13,386検体のうち12,640検体について良好なゲノムデータ (Coverage95%以上, Total read 10,000以上) が得られた. ゲノムデータのゲノム系統別検出数を表4に示した. 12,640検体の内, 変異株は多い順に, B. 1. 1. 529系統 (オミクロン株) が10,596検体 (BA. 1系統1,710検体, BA. 2系統3,269検体, BA. 4系統34検体, BA. 5系統5,583検体), B. 1. 617. 2系統 (デルタ株) が589検体, B. 1. 1. 7系統 (アルファ株) が275検体, R. 1系統が146検体, P1系統 (ガンマ株) が13検体, B. 1. 351系統 (ベータ株) が1検体であった.

また, 上記以外では多い順に, B. 1. 1. 214系統が381検体, B. 1. 1系統が342検体, B. 1. 1. 284系統が217検体, B. 1系統が18検体であった. なお, B. 1. 351系統 (ベータ株) 以外の10検体未満の系統はその他に含めた.

表4 新型コロナウイルスゲノム系統別検出数(n=12,640)

Pangolin系統	検体数
B.1	18
B.1.1	342
B.1.1.214	381
B.1.1.284	217
B.1.1.7(アルファ株)	275
B.1.351(ベータ株)	1
P.1(ガンマ株)	13
R.1	146
B.1.617.2(デルタ株)	589
BA.1(オミクロン株)	1,710
BA.2(オミクロン株)	3,269
BA.4(オミクロン株)	34
BA.5(オミクロン株)	5,583
その他	62
合計	12,640

また、良好なゲノムデータが得られた12,640検体のうち、発症日の判明した9,744検体について、系統の検出数と検出率を週ごとにまとめ、県内流行における主流系統の推移を調べた(図1, 図2)。なお、流行の拡大状況⁹⁾により、第1波を2020年2月1日から6月9日、第2波を6月10日から9月13日、第3波を9月14日から2021年2月22日、第4波を2月23日から6

月10日、第5波を6月11日から12月14日、第6波を12月15日から2022年6月5日、第7波を6月6日から10月7日、第8波を10月8日から2023年3月25日とした。なお、第6波と第7波の間の2022年5月前後に検体数が増えているのは、民間検査機関からの検体の提供が集中したことや、ホテル療養者の検体の搬入が多くあったことによる。

第1波の発症者数のピーク時(2020年4月1日~4月7日)はB.1.1系統が93.3%(90検体中84検体)、第2波のピーク時(2020年7月29日~8月4日)はB.1.1.284系統が100%(7検体全て)、第3波のピーク時(2020年12月30日~2021年1月5日)はB.1.1.214系統が76.0%(25検体中19検体)、第4波のピーク時(2021年5月5日~11日)はB.1.1.7系統(アルファ株)が76.2%(21検体中16検体)、第5波のピーク時(2021年8月11日~17日)はB.1.617.2系統(デルタ株)が98.6%(70検体中69検体)、第6波のピーク時(2022年2月2日~2月8日)はBA.1系統(オミクロン株)が96.4%(137検体中132検体)、第7波のピーク時(2022年7月27日~8月2日)はBA.5系統(オミクロン株)が96.8%(248検体中240検体)を占めていた。第7波及び第8波の亜型別の検出数を図3に示した。第8波のピーク時(2022年12月14日~12月20日)は亜型別に見ると、163検体中BF.5系統が21.5%(35検体)、BA.5.2系統が14.7%(24検体)、BQ.1.1系統が13.5%(22検体)、BA.5.2.6系統が8.6%(14検体)、BF.7系統が6.7%(11検体)、BA.5.2.1系統が6.1%(10検体)であり、他のBA.5系統の

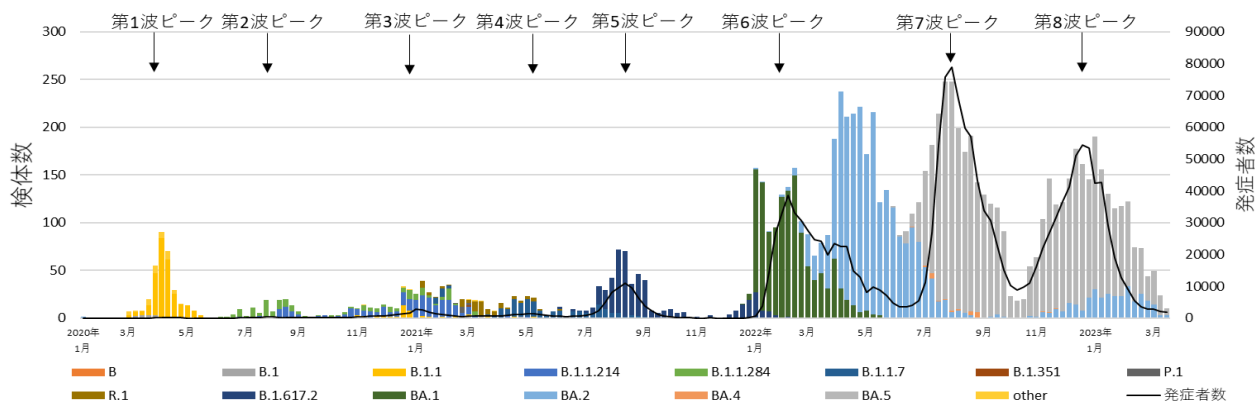


図1 新型コロナウイルス系統別検出数 (n=9,744)

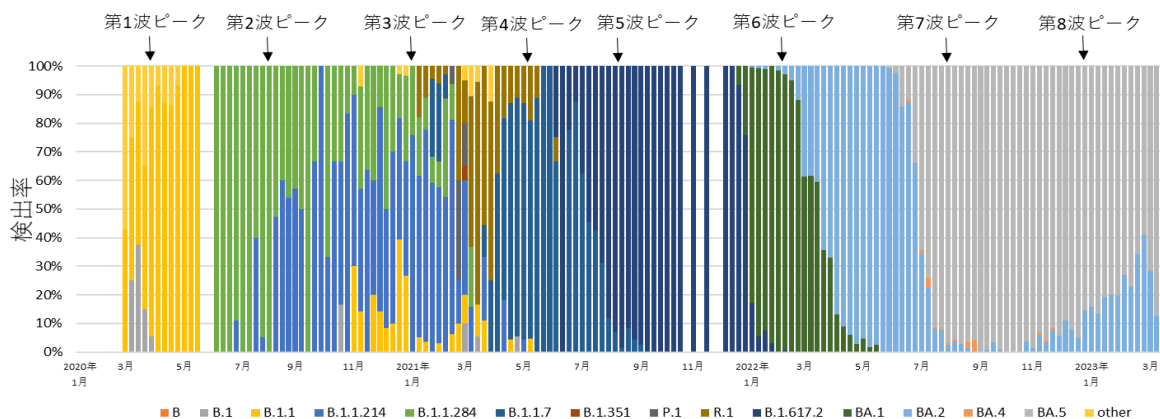


図2 新型コロナウイルス系統別検出率 (n=9,744)

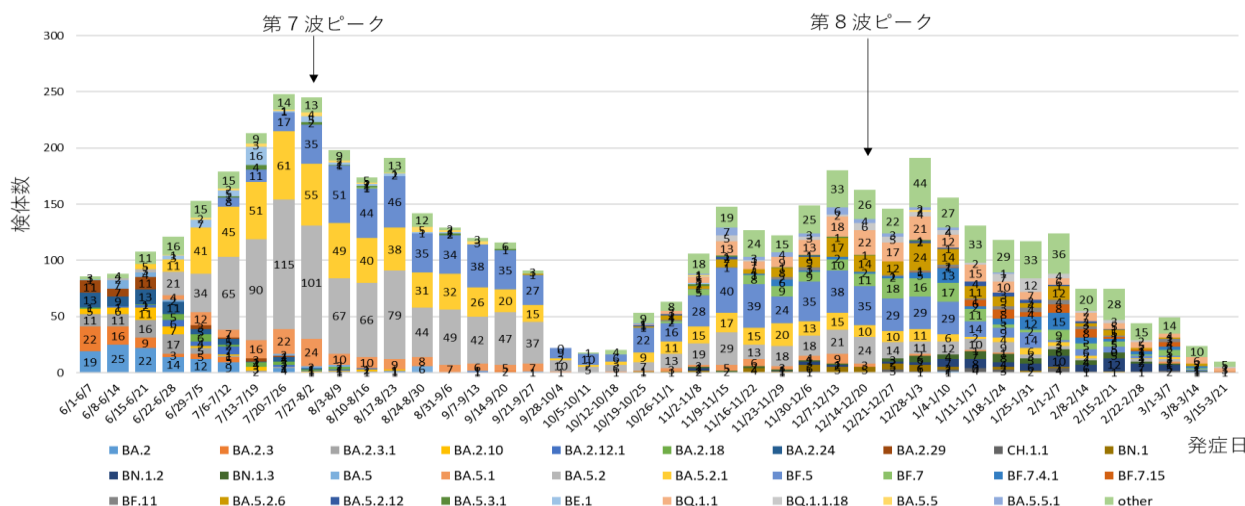


図3 新型コロナウイルス亜型別検出数(2022年6月1日～2023年3月21日)

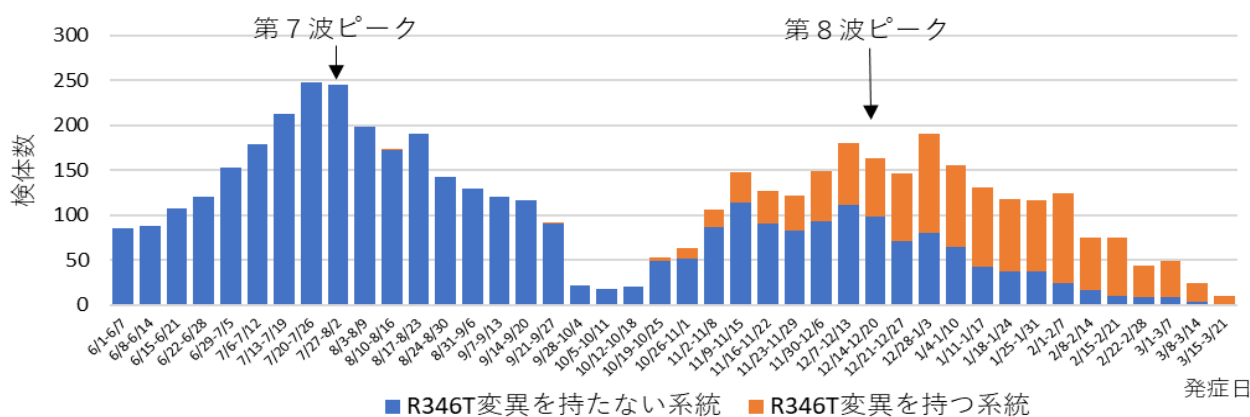


図4 R346T変異を持つ系統と持たない系統の推移(2022年6月1日～2023年3月21日)

がこれら BA.5系統の亜型で占められていた。一方で、スパイク蛋白質に免疫逃避性を与えることが示されている⁹⁾ R346T 変異を持つ複数の系統の占める割合が、2022年10月以降、全体として増加を続け、ピーク時には39.3%を占め、その後さらに増加していた(図4)。

まとめ

当所における新型コロナウイルスのリアルタイムPCR検査においては、民間検査機関の充実や、保健所の業務負担軽減のために積極的疫学調査を取りやめたことから、2022年12月以降は新型コロナウイルス疑い症例の検体の搬入がなくなった。しかし、オミクロン株の新しい系統の出現や、細分化された亜型による新たな流行が懸念されたため、患者株のゲノム解析を継続して行った。一方で変異株スクリーニング検査は、検査の性質上特定の変異を迅速に区別するには有用であるものの、時間が経過するとともにオミクロン株の変異が進み、変異株スクリーニングによる系統の区別が困難になってきたため、2022年8月12日に終了した。

ゲノム解析の結果から、第1波はB.1.1系統、第2波は

B.1.1.284系統、第3波はB.1.1.214系統、第4波はB.1.1.7系統(アルファ株)、第5波はB.1.617.2系統(デルタ株)、第6波はBA.1系統(オミクロン株)、第7波はBA.5系統(オミクロン株)が大半を占めており、各波における主流系統は波ごとに異なっていた。しかし、第8波は特定の系統ではなく、BA.5系統の複数の亜型が乱立し、1つの系統が大半を占めることはなかった。これらの亜系統が有する変異はR346, K444, V445, G446, N450, L452, N460, F486, F490, R493といった共通の部位に集中する傾向がみられており、それぞれの亜系統が類似した変異を独立に獲得するウイルスの収斂進化が起きているとの指摘がある¹⁰⁾。免疫逃避性を与えることが示されている R346T 変異の有無の推移で見ると、第8波のピークに向かって上昇傾向が見られた。

第7波までの流行の波はこれまで検出されてこなかった新しい変異株が引き起こしていたが、第8波は複数の亜型が乱立するものの、特定の変異の保有率が上昇するという異なる傾向が見られた。今後も新たな変異株の出現を迅速に探知するとともに、注視すべき変異箇所動向にも気を配り、各変異の変異株感染拡大抑止に繋がるよう海外や国内の変異株の情報の収集や検査、解析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) 江原勇登, 篠原美千代, 鈴木典子, 他: 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, 埼玉県衛生研究所報, 55, 82-84, 2021
- 2) 江原勇登, 鈴木典子, 大崎哲他: 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 (2020年1月~2022年3月), 埼玉県衛生研究所報, 56, 70-73, 2022
- 3) SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット,
https://www.takara-bio.co.jp/medical/pdfs/SARS-CoV-2_2307E.pdf (2023年7月27日現在)
- 4) 国立感染症研究所: L452R 変異検出マニュアル (ver. 1. 1) 令和3年5月21日
- 5) JDevelopment of new SNP genotyping assays to discriminate the Omicron variant of SARS-CoV-2, JJID, 2022-007. R2.
- 6) 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
- 7) PANGO Lineages,
<https://cov-lineages.org/index.html> (2023年7月27日現在)
- 8) 埼玉県衛生研究所感染症疫学情報センター: 2023年5月7日以前の COVID-19 (新型コロナウイルス感染症) の流行情報
<https://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/surveillance/covid-19.html> (2023年7月27日現在)
- 9) 新型コロナウイルス感染症に係る世界の状況報告 (更新102)
https://www.forth.go.jp/topics/20230218_00001.html (2023年7月27日現在)
- 10) Cao Y. et al.. 2022. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. bioRxiv.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.15.507787v3>. (preprint) 2022b