

長崎県環境保健研究センターにおける新型コロナウイルス検査の概要 (2020年度)

松本 文昭, 浦川 美穂, 小嶋 裕子
右田 雄二, 蔡 国喜, 高木 由美香, 川野 みどり, 田栗 利紹

Overview of Testing for SARS-CoV-2 in Nagasaki Prefectural Institute of Environment and Public Health (2020)

Fumiaki MATSUMOTO, Miho URAKAWA, Hiroko OJIMA
Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Yumika TAKAKI, Midori KAWANO, Toshitsugu TAGURI

キーワード : SARS-CoV-2, 新型コロナウイルス感染症, 市中肺炎
Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Community-acquired pneumonia

はじめに

2019年12月に中国湖北省で発生したSARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) による新型コロナウイルス感染症 (Coronavirus disease of 2019: COVID-19) は、その後、世界各地に広がり、世界的なパンデミックとなった。さらに、SARS-CoV-2は変異を繰り返し、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念されるSARS-CoV-2の変異株(Variant Of Concern) =VOC) が出現し、それらによる感染伝播が各国で広がっている¹⁾。COVID-19は、主に飛沫感染・接触感染を通じて広がり、1-14日間の潜伏期間を経て、発熱や呼吸器症状、全身倦怠感等で発症する²⁾。初期症状はインフルエンザや感冒と似ており、発症初期にこれらの疾患と区別するのは困難である³⁾ため、抗原検査や遺伝子検査による検査診断が重要となる。当センターでは既報⁴⁾のとおり2020年2月から行政検査対応を開始しており、ここでは、我が国においてCOVID-19の本格的な流行がはじまった2020年4月以降の検査結果について報告する。

材料および方法

1 供試検体

2020年4月1日から2021年3月31日までに、長崎県内でCOVID-19を疑われた者およびCOVID-19患者発生に伴う積極的疫学調査の一環として行われた接触者調査において、保健所長が検査を必要とする判断した者を調査対象とした。調査対象者から採取された鼻咽頭ぬぐい液等の上気道由来検体、

喀痰等の下気道由来検体を検査材料とした。それらの検体は、医療機関や保健所において採取され、主治医や保健所長が臨床症状等を記載した検査票を付して、保健所職員により当センターに搬入された。そのようにして集められた延べ10,381名分の10,665検体を検査に供した。尚、検査検体には、陽性者の陰性確認検査も含まれていた。

また、2020年末から日本国内において、海外渡航歴のない者からのVOCの検出報告が増加したことから、長崎県においても2021年2月26日からVOC1, 2, 3に共通するSpike proteinの501番目のアミノ酸変異(N501Y)を検出する変異株PCRの検査系を整備し、県内で検出された陽性事例に対するスクリーニング検査を開始した。当該検査のために収集された57名分57検体を変異株スクリーニング検査に供した。

2 検体検査

(1) 検体前処理

採取検体のうち鼻咽頭拭い液等の上気道由来検体は、10秒間ボルテックスした後の懸濁液を2.0 mLスクリューキャップチューブに移し、12,000 rpm, 15 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140 μ LをRNA抽出に供した。

喀痰検体は、1~3倍量の滅菌済PBS (-) を添加後、ボルテックスにより懸濁させ、2.0 mLスクリューキャップチューブに移した後、15,000 rpm, 30 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140 μ LをRNA抽出に供した。

(2) RNA抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて、添付文書に基づき精製操作を行い、キットに同梱されているBuffer AVEにより溶出した60 µLのRNA抽出液をPCR検査に供した

(3) PCR検査

新型コロナウイルス検出マニュアル⁴⁾ に記載されたプライマーおよびプローブを用いて、real time PCR法によるSARS-CoV-2の遺伝子検出を実施した。PCR 試薬は、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher) を用いた反応を行い、40サイクル以内に増幅曲線の立ち上がりを確認できた検体を陽性と判定した。

(4) N501Y変異株PCR検査

国立感染症研究所より例示された「リアルタイム one step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike N501Y変異の検出」に示されたプライマーおよびプローブを用いて、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher) による反応を行い、N501Y変異の有無を判定した。

結 果

調査期間中に搬入された10,381名分10,665検体のうち、220名分302検体からSARS-CoV-2の遺伝子が検出された。尚、302検体のうち73検体は陽性者の陰性確認検査であった。陽性者の内訳は、何らかの症状を呈した「患者」が172名、特に症状が確認されなかった「無症状病原体保有者」が48名であった。

変異株PCR検査のために収集された57名分57検体を調査した結果、3名分3検体からN501Y変異を有するSARS-CoV-2の遺伝子を検出した。53名の検体からはN501Y変異は検出されず、1名は遺伝子量が極めて少ないため判定不能であった。陽性となった3名のうち2名は国立感染症研究所においてVOC1 (アルファ型)と同定され、残る1名は遺伝子量が極めて少なかったため解析不能であった。

考 察

2020年度に当センターで実施したCOVID-19にかかる行政検査において陽性となった288名のうち無症状者が212名と7割を占めていた。これは、医療機関や民間検査センターのCOVID-19検査能力の拡充に伴い、当センターに搬入される主な検体が、接

触者調査で採取された無症状者に由来するものが多くなった影響と考えられた。

2021年6月現在も、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念されるSARS-CoV-2の変異株 (VOC) の感染者が世界各地から継続して報告されており、国内においても渡航歴のない者や、渡航者と疫学的関連がない者からの新規変異株感染者が報告されている状況にある⁶⁾。新たな変異株の出現・流行に備えて、それらを迅速に検出可能な検査体制を維持していくことが必要と考えられた。

謝 辞

COVID-19疑い例調査にご協力頂いた各医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました佐世保市、県立各保健所並びに各振興局等の関係諸氏に深謝する。

参 考 文 献

- 1) World Health Organization, Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2021.7.14)
- 2) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: 〈注目すべき感染症〉新型コロナウイルス感染症 (COVID-19), IDWR 2020年第23号
- 3) 令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業 一類感染症の患者等の発生に備えた臨床的対応に関する研究班: 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の診療の手引き 第2.1版, p6
- 4) 長崎県環境保健研究センター所報 65, (2019) 資料, 長崎県環境保健研究センターにおける新型コロナウイルス検査の概要, <https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2021/03/1614836793-1.pdf> (2021.7.14)
- 5) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>
- 6) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: IDWR 2021年第25号〈注目すべき感染症〉 直近の新型コロナウイルス感染症およびRSウイルス感染症の状況