

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 (2021年度)

松本 文昭, 高木 由美香, 中峯 文香, 右田 雄二, 蔡 国喜, 川野 みどり,
山口 結奈, 井原 基, 吉川 亮

長崎県では、2020年2月からSARS-CoV-2のreal time PCRによる検査を開始しており、2021年4月1日から2022年3月31日までに延べ22,636検体の検査を行った。また、変異株検出のためのスクリーニングPCRを行うとともに2021年7月からは次世代シーケンサーを用いたゲノム解析体制を整備し、県内流行株の詳細な系統分類を行った。その結果、2021年4月から7月にかけての流行第4波においてはアルファ株B.1.1.7系統が、続く2021年8月から10月にかけての第5波においてはデルタ株AY.29系統が主要な流行株であった。2022年1月から始まった第6波においてはオミクロン株BA.1.1.2系統が多数を占めていたものの、2月頃から新たにBA.2系統が検出され始め、3月末にかけて置き換わりが進んでいった。次世代シーケンサーを活用したサーベイランス体制を継続することにより、新たな変異株による流行の端緒を早期に探知でき、迅速なまん延防止対策に寄与できると考えられた。

キーワード：SARS-CoV-2、新型コロナウイルス感染症、変異株、ゲノム解析

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変異株 (Variant Of Concern) =VOC) が出現し、WHOを中心として世界的なサーベイランス体制が取られている¹⁾。我が国においても、国立感染症研究所がWHOの評価を参考にいくつかの変異株をVOCに位置付け、発生動向を監視してきたが、2022年4月28日現在、デルタ株とオミクロン株をVOCに位置付けている²⁾。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。初期症状はインフルエンザや感冒と似ているため、発症初期にこれらの疾患と区別するのは困難であることから、抗原検査や遺伝子検査による検査診断が重要となる³⁾。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、2021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 調査期間

2021年4月1日から2022年3月31日

2 供試検体

(1) 陽性者の接触者調査

長崎県内で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と判断した者を調査対象とし、調査対象者から採取された鼻咽喉ぬぐい液等の上気道由来検体、喀痰等の下気道由来検体および唾液を検査材料とした。それらの検体は、医療機関や保健所において採取され、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22,636検体を検査に供した。

(2) 変異株PCR

2020年度から引き続き、アルファ株の特徴であるSpike proteinの501番目のアミノ酸変異(N501Y)を検出する変異株PCRを行うとともに、新たに出現したデルタ株の特徴である452番目のアミノ酸変異(L452R)を検出する検査系を整備した。それらの方法を用いて、県内で陽性となった事例に対し変異株PCRによるスクリーニング

を実施した。当センターにおいて陽性となった検体並びに医療機関において陽性となった検体のうち保健所が必要と認め、検査依頼のあったもの延べ1,074検体を変異株スクリーニング検査に供した。

(3) ゲノム解析

SARS-CoV-2の全塩基配列に基づく変異株の確定検査のため、国立感染症研究所に検体を送付し解析を依頼するとともに、2021年7月からは、当センターにおいても次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer; NGS)によるSARS-CoV-2のゲノム解析を開始した。(1)および(2)の検査においてSARS-CoV-2遺伝子陽性となったもののうち、ゲノム解析に必要と考えられるRNA量 (real time PCRにおいてCt値27以下)が見込まれた1,056検体をゲノム解析に供した。

3 方法

(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。

喀痰検体や唾液検体は、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, Hilden, Germany) 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 μ LのRNA抽出液をPCR検査やゲノム解析に供した。

(3) PCR検査

新型コロナウイルス検出マニュアル⁵⁾ 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, Waltham, United States) を用いて検出マニュアルに記載された条件で反応を行い、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。2022年1月からは、

厚生労働省より自治体における新型コロナウイルス検査の支援として配布されたTaqPath SARS-CoV-2検出キット (ThermoFisher)を用いた検査に切り替えた。当該キットを用いた検査では、N protein, ORF1abおよびS protein領域の3か所の遺伝子を増幅し、キット添付文書に基づき37サイクル以内に増幅曲線が認められたものを陽性と判定した。

(4) 変異株PCR

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (TaKaRa, Kusatsu, Japan) に、アルファ株判別用のPrimer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (TaKaRa)またはデルタ株判別用のPrimer/Probe L452R (SARS-CoV-2) Ver.2 (TaKaRa)を組み合わせ、製品添付文書に従って反応を行い、40サイクル以内に増幅曲線が認められたものについて、各検出系におけるWild (野生型 = 陰性)であるか、Mutant (変異株 = 陽性)であるかを判別した。

(5) ゲノム解析

SARS-CoV-2のゲノム解析は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター (以下、感染研ゲノムセンター) が作成したマニュアル⁶⁾ に準拠して反応試薬を調製のうえMiSeq Reagent Micro Kit (Illumina, San Diego, United States)を用いてゲノム解析を行った。すなわちLunaScript RT Super Mix (New England Biolabs: NEB, Ipswich, United States)によりサンプルRNAからcDNAを合成し、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)によりMultiplex PCRを行った。増幅反応後、AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, United States)を用いて精製し、Qubit ds DNA HS Assay Kit (ThermoFisher)により二本鎖DNA濃度を定量した。精製後の増幅産物に対してQIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)による断片化およびアダプター付加を行い、再度AMPure XPによる精製を行ったのち、反応産物を1本のチューブにプールした。そのようにプールした反応産物を0.2 N NaOH (富士フィルム和光純薬)により5分間室温にて変性したのち、MiSeq Reagent Micro Kitに同梱されたHT1 Bufferを用いて10 pMに希釈したものをMiSeqにロードして解析した。その結果得られた解析データは、感染研ゲノムセンターが作成したSARS-CoV-2ゲノム情報解析サイト「COG-JP」にアップロードし、アセンブリとNextClade⁷⁾並びにPangoLineage⁸⁾による系統分類に使用した。

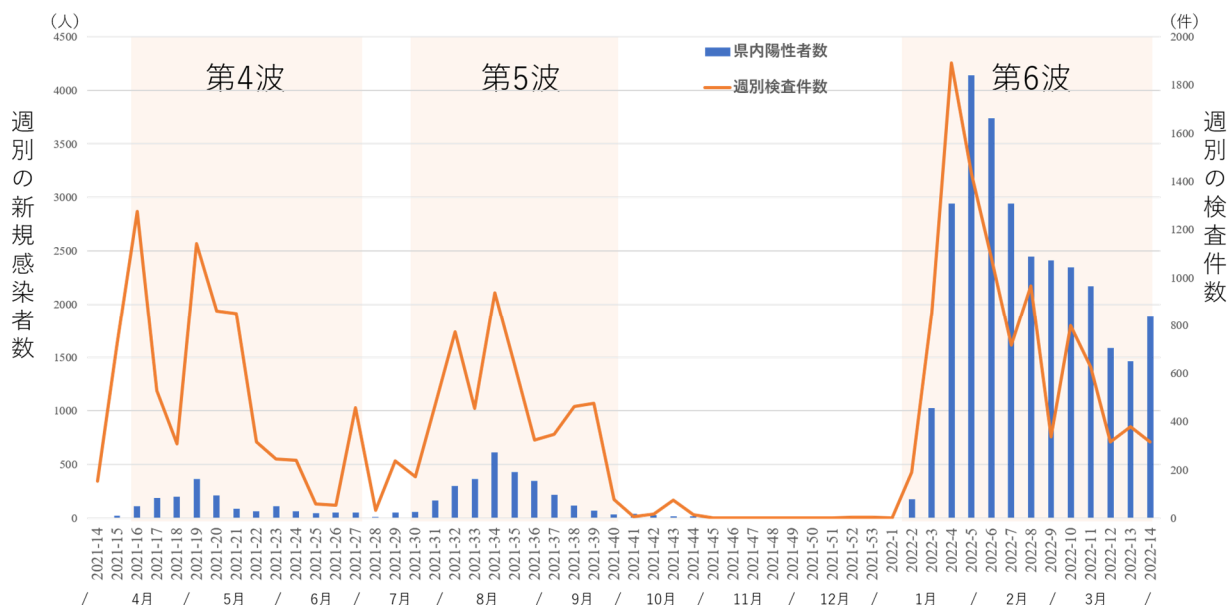


図1 環境保健研究センターにおける週別検査件数と長崎県における週別新規感染者数の推移
 流行波は、長崎県における新型コロナウイルス感染対応段階の目安であるステージ2(感染者の漸増)が発表された時点から解除されるまでを表している。

参考：長崎県新型コロナウイルス感染段階

https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/corona_nagasaki/corona_kansendankai/ (2022.6.23)

結果

1 陽性者の接触者調査

調査期間中に搬入された22,636検体のうち、1,858検体からSARS-CoV-2の遺伝子が検出された。20,773検体からはSARS-CoV-2遺伝子が検出されず、残る5検体はCt値40以上で増幅を疑う反応が認められたが判定保留とした。判定保留検体については、管轄保健所に追加の検体採取と再検査を推奨したが、追加検査依頼はなかった。

2 変異株PCR

変異株PCRに供した1,074検体のうちN501Y変異株PCRに供した258検体を検査した結果、陽性が211検体、陰性が40検体、判定不能(検出限界未満)が7検体であった。L452R変異株PCRに供した892検体のうち陽性が316検体、陰性が532検体、判定不能(検出限界未満)が44検体であった。

3 ゲノム解析

ゲノム解析に供した1,056検体のうち1,021株のSARS-CoV-2ゲノムを決定した。NextCladeによる解

析の結果、アルファ株(20I Alpha, V1)が197株、デルタ株(21J Delta)が283株、オミクロン株(21Kおよび21L)が541株であった。それぞれの変異株のPangoLineageによる系統分類の結果、アルファ株は全てB.1.1.7に分類され、デルタ株はAY.29系統(AY.29.1, AY.29.2を含む)が278株、AY.25系統とAY.3系統がそれぞれ2株、AY.103系統が1株であった。オミクロン株はBA.1系統(BA.1, BA.1.1, BA.1.1.1, BA.1.1.2, BA.1.15を含む)が525株、BA.2系統(BA.2, BA.2.10, BA.2.3.1を含む)が16株であった。

考察

調査期間中における週別検査件数の推移と長崎県内で報告された陽性者数の組み合わせグラフを図1に示す。当センターにおける週当たりの検査件数は、2021年4月から始まった第4波においては、流行開始直後の2021年第16週(2021/4/19~4/25)の1,275件/週をピークとして増減を繰り返しながら、2021年第28週(2021/7/12~7/18)に一旦落ち着いた。しかし、流行第5波が2021年第30週

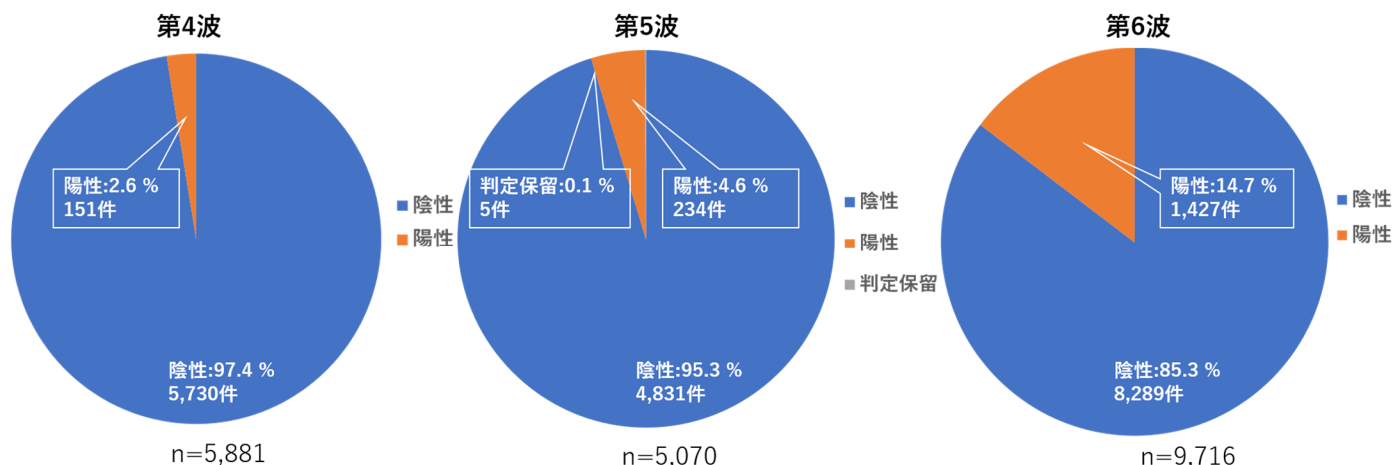


図2 流行の波ごとの検査件数と陽性率

(2021/7/26~8/1)から始まると検査件数が急増し、2021年第34週 (2021/8/23~8/29)には937件/週まで増加した。第5波における検査件数は2021年第34週をピークに、2021年第40週 (2021/10/4~10/10)には78件/週まで減少し、その後しばらく小康状態が続いた。しかし、2022年第2週 (2022/1/10-1/16)からオミクロン株による流行第6波が始まると検査件数は再び急増し、2022年第5週 (2022/1/31~2/6)には、調査期間を通して最大の1,892件/週まで増加した。その後は、クラスター発生に伴う調査による微増はあったものの、検査件数は漸減傾向を示していた。

各流行波における検査件数と陽性率を図2に示す。第4波と第5波では、それぞれ2.6%と4.6%であったが、第6波においては14.7%であり、それまでの流行波における陽性率よりも高かった。第6波の流行株であるオミクロン株は、デルタ株と比較した時に接触者への伝播力が高いことが報告されており⁹⁾、その影響による可能性が考えられた。

ゲノム解析による系統分類並びに流行波ごとの系統別検出数を図3に示す。本県における流行第4波はアルファ株B.1.1.7系統が、第5波はデルタ株AY.29系統が主な流行株と考えられ、全国的な傾向と同様であった¹⁰⁾。第6波の流行株であるオミクロン株の系統別検出結果を図4に示す。2022年第8週 (2022/2/21~2/27)まではBA.1系統が流行の主流であったが、第9週 (2022/2/28~3/6)にBA.2系統が検出されると、徐々に検出割合が高まり、第13週 (2022/3/28~4/3)には、解析株の半数がBA.2系統であった。2022年6月時点では、本県における流行の主流系統はBA.2系統に置き換わっている¹¹⁾。ゲノム解析の結果から、本格的な流行波が始まる前に、次

の流行主流株が検出されていることから、変異株PCRやゲノム解析によるサーベイランスを継続することで、新たな変異株による流行の端緒を早期に探知できる可能性がある。それらの解析結果を行政等の関係機関と共有することで、迅速なまん延防止対策に寄与できると考えられる。今後も、新たな変異株の出現・流行に備えて、検査・解析体制を維持していくことが必要と考えられた。

謝 辞

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長崎市、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/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2022.5.20)
- 2) 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) の変異株について (第16報) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11119-covid19-16.html> (2022.5.20)
- 3) 令和4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7.2版, p6
- 4) 長崎県環境保健研究センター所報 66 , (2020) 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
 - 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
 - 6) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター: 新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル-Qiagen 社 QiaSEQ FX 編 ver.1.4
 - 7) NextClade: <https://clades.nextstrain.org/> (2022.6.23)
 - 8) PangoLineage: <https://pangolin.cog-uk.io/> (2022.6.23)
 - 9) UK Health Security Agency: SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England, Technical briefing 32, 17 December 2021
 - 10) 厚生労働省: 新型コロナウイルス ゲノムサーベイランスによる系統別検出状況 (国立感染症研究所), https://www.mhlw.go.jp/stf/eisakunitsuite/newpage_00061.html (2022.5.20)
 - 11) 長崎県: 長崎県内の発生状況 ゲノム解析状況, https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/corona_nagasaki/corona_nagasaki_shousai/ (2022.6.23)

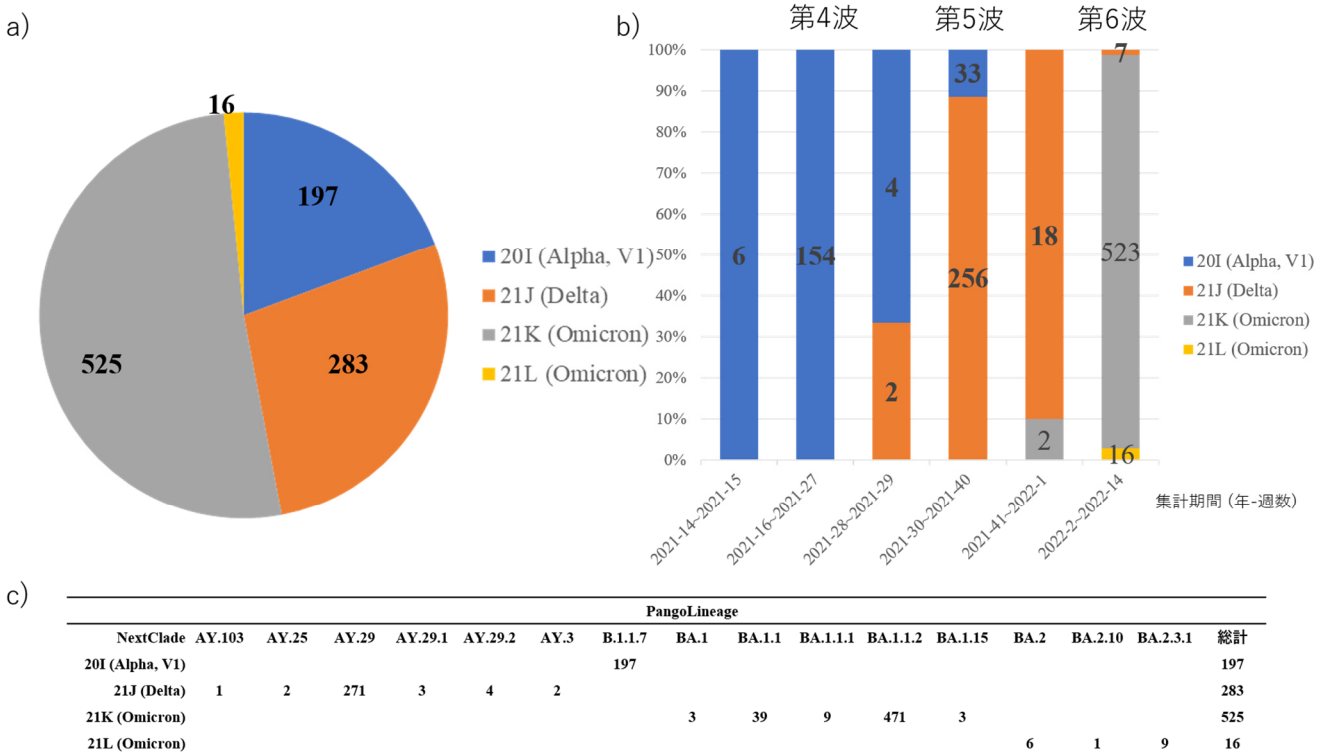


図3 長崎県検出株のNextClade, PangoLineageによる系統分類

- a): 長崎県において決定した1021株のNext Cladeによる分類結果 (円グラフ中の表示は、Clade名, 検出数, 全体に占める検出率を表す)
- b): 決定した1021株の各流行波における検出率の推移
- c): 検出されたCladeのPangoLineageによる系統分類結果 (縦軸がNextCladeによる分類、横軸が各CladeのPangoLineageによる系統分類を示す)

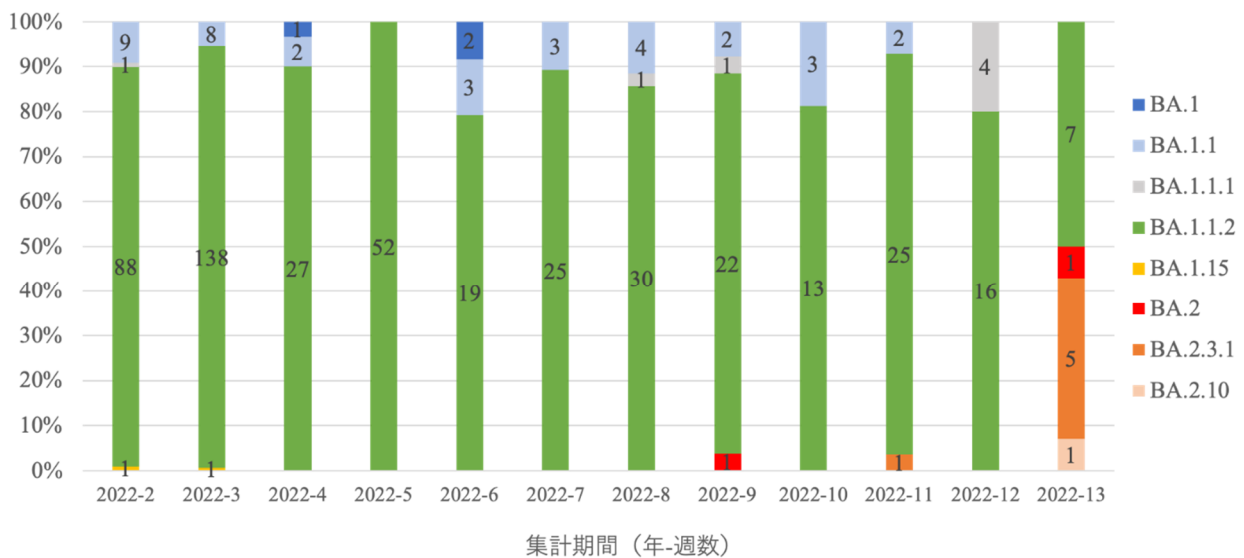


図4 第6波におけるオミクロン株検出系統の推移

Overview of Testing for SARS-CoV-2 in Nagasaki Prefectural Institute of Environment and Public Health (2021)

Fumiaki MATSUMOTO, Yumika TAKAKI, Fumika NAKAMINE, Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Midori KAWANO, Yuina YAMAGUCHI, Motoki IHARA and Akira YOSHIKAWA

Nagasaki Prefecture began testing for SARS-CoV-2 using real-time polymerase chain reaction (PCR) in February 2020, and a total of 22,636 samples were tested from April 1, 2021, to March 31, 2022. Furthermore, screening PCR was performed to detect mutant strains, and a genome analysis system using a next-generation sequencer was developed in July 2021 to perform a detailed phylogenetic classification of dominant strains in the prefecture. The findings indicated that strain Alpha B.1.1.7 was the primary epidemic strain from April to July 2021, and Delta AY.29 was the primary epidemic strain from August to October 2021. Furthermore, from January to March 2022, the Omicron BA.1.1.2 was the predominant strain, but a new BA.2 strain was detected in February and was replacing it by the end of March.

Continuous surveillance using next-generation sequencers was practiced to facilitate the early detection of the beginning of an epidemic caused by a new mutant strain and to take prompt measures to stop the spread of the disease.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Variant of Concern, Whole Genome Sequence