

香川県環境保健研究センターにおける SARS-CoV-2 検査状況について

Status of SARS-CoV-2 Testing in Kagawa Prefectural Research Institute for Environmental sciences and public health

桑原 憲司 梶谷 奈生* 細井 綾子 有塚 真弓 土田 由佳理
 Kenji KUWAHARA Daiki MASUTANI Ayako HOSOI Mayumi ARIZUKA Yukari TSUCHIDA
 多田 郁美* 目黒 響子 岩下 陽子 関 和美 福田 千恵美
 Ikumi TADA Kyoko MEGURO Yoko IWASHITA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

要 旨

2019年12月に初めて確認された新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は2020年1月に日本国内でも確認された。そのため当センターでも検査体制を構築し、5類移行となる2023年5月までおよそ3年にわたり感染が疑わしい患者やそれに関連する接触者の検査を行ってきたためその結果についてまとめた。

また、遺伝子変異によって感染力や病原性が異なる変異株が世界的に報告されるようになり、患者数や重症者数に大きな影響を与えた。そこで変異株を早期に探知するためのスクリーニング検査や、発生当初は国立感染症研究所ゲノム解析センターに依頼していたゲノム解析を当センターで実施するようにした。その2つの結果についてもあわせて報告する。

キーワード：新型コロナウイルス SARS-CoV-2 香川県 変異株 ゲノム解析

I はじめに

2019年12月に中華人民共和国(中国)武漢市で初めて確認された新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は、世界各国に拡大し、2020年1月には日本国内にも流入した。その後、変異を繰り返しながら世界的に大きな流行を引き起こした。

香川県環境保健研究センターでは2020年1月29日より検査を開始し、多い時には1日300件ほどの検査を実施した。

2020年12月に英国で最初に報告され各国に広まったアルファ株の国内発生を早期探知することを目的として2021年1月から変異株スクリーニング検査を実施した。その後、デルタ株やオミクロン株出現の際にもそれらに合わせた変異株スクリーニングを実施した。

ゲノム解析については、2020年5月から国立感染症研究所へのSARS-CoV-2陽性検体の送付を開始した。2021年7月からは当センターで次世代シーケンサーを用いたゲノム解析実施の体制を整え、SARS-CoV-2全ゲノム解析を開始した。以降、新たな遺伝子の変異や流行している

ウイルス系統の推移を監視している。

これらSARS-CoV-2の検査について、当センターでの実施状況を報告する。対象期間は全数把握が適応されていた2020年1月から2023年5月7日とした。

II 方法

1 SARS-CoV-2 核酸検出検査

SARS-CoV-2核酸検出については、国立感染症研究所が示したマニュアル^{1) 2)}に従って実施した。鼻咽頭拭い液や唾液等の検体からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いてRNAを抽出後、ワンステップリアルタイムPCR法で検査を実施した。PCR試薬はQuantiTect Probe RT-PCR kit(QIAGEN社)、One StepPrimeScript RT-PCR Kit(Perfect Real Time)(タカラバイオ株式会社)またはTaqMan Fast Virus 1step Master Mix(Thermo Fisher Scientific社)のいずれかを用いた。プライマー・プローブは、当初NセットとN2セットを用いた各2施行で実施していたが、検体数の増加により2020年3月中旬からN2のみ2施行で実施した。2021年11月下旬以降はN2セ

*香川県立中央病院中央検査部

ットとS2セットの2領域を同時に2施行で実施した(マルチプレックス法)。また、検体数が1日の上限を推移した際には、Takara SARS-CoV-2 ダイレクトPCR 検出キット(タカラバイオ株式会社)も併用し、添付文書³⁾に従って実施した。リアルタイム PCR 機器は QuantStudio5 (Applied Biosystems 社) または 7500Fast (Applied Biosystems 社) を使用した。

2 変異株スクリーニング検査

2021年1月9日から2021年6月7日までの期間に、B.1.1.7系統(アルファ株)検出のスクリーニングとしてN501Y検出用プライマー⁴⁾を用いたリアルタイムPCR法を実施した。2021年5月23日から2021年10月21日までは、B.1.617.2系統(デルタ株)検出のスクリーニングとしてL452R検出用プライマー⁵⁾を用いた。また2021年12月27日から2022年2月11日まではBA.1系統(オミクロン株)検出のスクリーニングとしてもL452R検出用プライマーを用いた。試薬はOneStep PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社)を用いて国立感染症研究所のマニュアル^{4) 5)}に準じて実施した。

3 ゲノム解析

ゲノム解析は、国立感染症研究所により示されたマニュアル⁶⁾に記載の方法を用いた。次世代シーケンサーはiSeq100 System(illumina 社)を用いた。得られたデータを国立感染症研究所が開発した解析サイト COG-JP (COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan) にアップロードして SARS-CoV-2 の全長配列を取得しPangolin 系統解析を実施した。

解析にはウイルス遺伝子量が豊富にある、リアルタイムPCRの定量値(Ct 値)が27以下の検体を主に用いた。得られたデータについて、データの質がおおむね一定の基準を満たしたもの(genome coverage $\geq 98\%$, median read depth $\geq 300\times$)は配列情報をGISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)⁷⁾に登録し、全世界にむけて香川県のデータを公開した。

III 検査状況

1 SARS-CoV-2 核酸検出検査

(1) 月別検査件数

香川県では2020年1月29日より検査を開始した。月別の検査件数を示す(表1)。

当センターにおける検査対象は、発生当初(第1波から第2波)は医療機関などでの検査体制が整ってなかったこともあり、各医療機関から保健所に依頼のあった感染が疑わしい発熱患者の検査が主だった。その後、クラスター⁸⁾が発生する要因などが判明してきた第2波以降は濃厚接触者⁸⁾に加えて濃厚接触者には該当しないが陽性者との共通の行動歴のある接触者の検査を主に行い、感染の封じ込めに尽力した。

陽性者数の増加に伴い、濃厚接触者や接触者の数も比例して増加するため波を追うごとに検査件数も増えた。

そのため最も検査件数が多かったのは、第5波に当たる2021年8月の7647件で、次に多かったのは第6波に当たる2022年2月の6765件であった。

第7波以降は、濃厚接触者の検査対象者の縮小や、医療機関等での検査体制が充実したことにより、当センターでの検査件数は次第に減少した。

表1 月別検査件数

| | 2020年 | 2021年 | 2022年 | 2023年 | 週対応 |
|-----|-------|-------|-------|-------|---------|
| 1月 | 4 | 4147 | 5940 | 82 | 1w~5w |
| 2月 | 33 | 1770 | 6765 | 33 | 5w~9w |
| 3月 | 245 | 837 | 4743 | 10 | 9w~13w |
| 4月 | 1480 | 3701 | 3887 | 8 | 13w~17w |
| 5月 | 601 | 5416 | 3412 | 1 | 17w~22w |
| 6月 | 266 | 760 | 1359 | | 22w~26w |
| 7月 | 1304 | 807 | 2062 | | 26w~31w |
| 8月 | 1616 | 7647 | 1125 | | 31w~35w |
| 9月 | 1128 | 2104 | 172 | | 35w~39w |
| 10月 | 540 | 157 | 43 | | 39w~44w |
| 11月 | 998 | 19 | 77 | | 44w~48w |
| 12月 | 2498 | 101 | 95 | | 48w~53w |
| 総計 | 10713 | 27466 | 29680 | 134 | |

(2) 検出状況

週ごとの当センターでの検査実施状況と香川県の陽性者数の推移を示す(図1, 図2)。香川県で最初に陽性を確認したのは2020年3月17日であった。各波における7日間移動平均の最大値を見ると、1日当たり順に第1波は3人、第2波は2人、第3波は18人、第4波は44人、第5波は71人、第6波は409人、第7波は2018人、第8波は1728人であった。オミクロン株が確認された第6波以降は陽性者数が第5波以前と比べて大きく増えた。

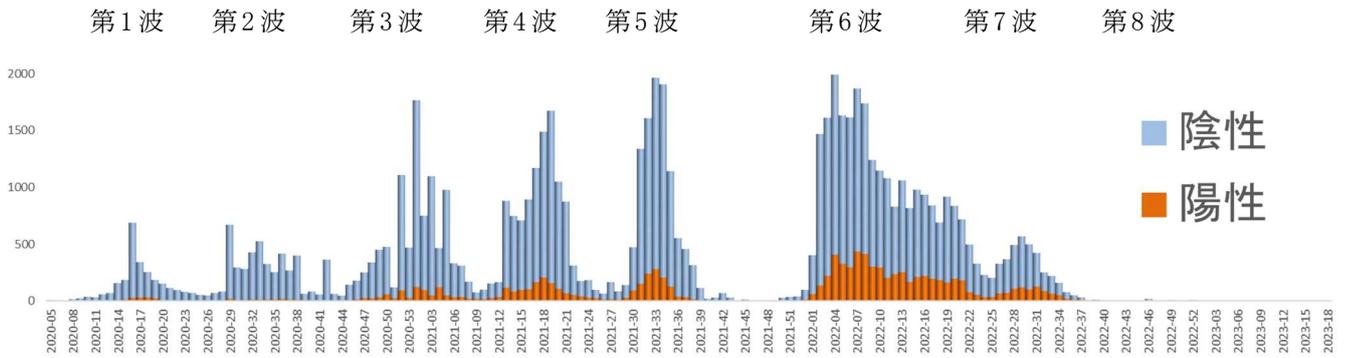


図1 当センターの検出状況（週別）



図2 香川県陽性者数（週別）

2 変異株スクリーニング検査

(1) アルファ株

アルファ株を探知するための N501Y スクリーニング検査について実施状況を示す（表 2）。501 番目のスパイクタンパク質に関与する遺伝子配列を確認し、N（アスパラギン）になるものは陰性（従来株/N501）、Y（チロシン）となるものを陽性（アルファ株疑い/501Y）と判定した。

2021 年 1 月から開始し、陽性率が 100%となった 2021 年 6 月に終了し、その間 1136 検体の検査を実施した。陽性が初めて検出されてから 3 週間で陽性の割合は半数以上を占めるようになり、およそ 3~4 カ月をかけて完全に置き換わり全て 501Y となった。ゲノム解析も国立感染症研究所に検体を送付し並行して行っていたが割合はおおむね同様の推移を示した。

表 2 スクリーニング検査実施状況（アルファ株）

| (年-週) | N501 | 判定不能 | 501Y | 総計 | 501Y 陽性率※1 | アルファ株割合 (ゲノム解析) |
|---------|------|------|------|------|---------------|--------------------|
| 2021-01 | 18 | | | 18 | 0% | 0% |
| 2021-02 | 59 | 4 | | 63 | 0% | 0% |
| 2021-03 | 22 | | | 22 | 0% | 0% |
| 2021-04 | 37 | 2 | | 39 | 0% | 0% |
| 2021-05 | 25 | 3 | | 28 | 0% | 0% |
| 2021-06 | 10 | | | 10 | 0% | 0% |
| 2021-07 | 9 | 1 | | 10 | 0% | 0% |
| 2021-08 | 6 | 1 | | 7 | 0% | 0% |
| 2021-09 | 3 | 1 | 1 | 5 | 25.0% | ※2 |
| 2021-10 | 4 | | 1 | 5 | 20.0% | 33.3% |
| 2021-11 | 8 | 1 | | 9 | 0% | 0% |
| 2021-12 | 3 | | 13 | 16 | 81.3% | 92.9% |
| 2021-13 | 38 | 6 | 57 | 101 | 60.0% | 66.7% |
| 2021-14 | 5 | 6 | 52 | 63 | 91.2% | 91.7% |
| 2021-15 | 4 | 4 | 62 | 70 | 93.9% | 82.8% |
| 2021-16 | 4 | 4 | 76 | 84 | 95.0% | 97.4% |
| 2021-17 | 10 | 2 | 123 | 135 | 92.5% | 94.5% |
| 2021-18 | 3 | 13 | 163 | 179 | 98.2% | 100% |
| 2021-19 | 6 | | 128 | 134 | 100% | 100% |
| 2021-20 | 2 | 5 | 71 | 78 | 97.3% | 96.1% |
| 2021-21 | | 4 | 36 | 40 | 100% | 100% |
| 2021-22 | | 1 | 14 | 15 | 100% | 100% |
| 2021-23 | | | 5 | 5 | 100% | 100% |
| 総計 | 270 | 64 | 802 | 1136 | | |

※1 判定不能は除く ※2 (解析対象無し)

(2) デルタ株

デルタ株を探知するための L452R スクリーニング検査

について実施状況を示す(表3)。452番目のスパイクタンパク質に關与する遺伝子配列を確認し、L(ロイシン)になるものは陰性(従来株/L452)、R(アルギニン)となるものを陽性(デルタ株疑い/452R)と判定した。

2021年5月から開始し、陽性率が100%となった2021年10月に終了し、その間1509検体の検査を実施した。陽性が初めて検出されてから7週間で陽性の割合は半数以上を占めるようになり、およそ3~4ヵ月をかけて完全に置き換わり、全て452Rとなった。ゲノム解析で確認したデルタ株の割合もおおむね同様の推移を示した。

表3 スクリーニング検査実施状況(デルタ株)

| (年-週) | L452 | 判定不能 | 452R | 総計 | 452R 陽性率※1 | デルタ株割合 (ゲノム解析) |
|---------|------|------|------|------|---------------|-------------------|
| 2021-20 | 2 | | | 2 | 0% | 0% |
| 2021-21 | 34 | 6 | | 40 | 0% | 0% |
| 2021-22 | 14 | 1 | | 15 | 0% | 0% |
| 2021-23 | 17 | | | 17 | 0% | 0% |
| 2021-24 | 12 | | | 12 | 0% | 0% |
| 2021-25 | 8 | 1 | 1 | 10 | 11.1% | 16.7% |
| 2021-26 | 6 | | | 6 | 0% | 0% |
| 2021-27 | 9 | 1 | 2 | 12 | 18.2% | 25.0% |
| 2021-28 | 14 | | | 14 | 0% | 0% |
| 2021-29 | 24 | | 2 | 26 | 7.7% | 8.7% |
| 2021-30 | 69 | 2 | 34 | 105 | 33.0% | 38.5% |
| 2021-31 | 95 | 6 | 64 | 165 | 40.3% | 50.0% |
| 2021-32 | 89 | 7 | 170 | 266 | 65.6% | 58.2% |
| 2021-33 | 68 | 7 | 250 | 325 | 78.6% | 67.7% |
| 2021-34 | 35 | 4 | 188 | 227 | 84.3% | 78.2% |
| 2021-35 | 27 | 4 | 121 | 152 | 81.8% | 82.5% |
| 2021-36 | 7 | 2 | 42 | 51 | 85.7% | 83.9% |
| 2021-37 | 1 | 3 | 34 | 38 | 97.1% | 100% |
| 2021-38 | 3 | 1 | 12 | 16 | 80.0% | 100% |
| 2021-39 | 1 | | 3 | 4 | 75.0% | 100% |
| 2021-40 | | | 3 | 3 | 100% | 100% |
| 2021-41 | | | 1 | 1 | 100% | ※2 |
| 2021-42 | | | 2 | 2 | 100% | 100% |
| 総計 | 535 | 45 | 929 | 1509 | | |

※1 判定不能は除く ※2 (解析対象無し)

(3) オミクロン株

オミクロン株を探知するためのL452Rスクリーニング検査について実施状況を示す(表4)。452番目のスパイクタンパク質に關与する遺伝子配列を確認し、R(アルギニン)になるものは陰性(従来株)、L(ロイシン)となるものを陽性(オミクロン株疑い)と判定した。

2021年12月から開始し、陽性率がおおむね90%以上で推移するようになった2022年2月に終了した。なおそれ以後、変異株の推移はゲノム解析にて判断することにした。陽性が初めて検出された翌週には陽性の割合は8割を超え、ゲノム解析で確認したオミクロン株の割合も同

様の推移を示した。

表4 スクリーニング検査実施状況(オミクロン株)

| (年-週) | 452R | 判定不能 | L452 | 総計 | L452 陽性率※1 | オミクロン株割合 (ゲノム解析) |
|---------|------|------|------|-----|---------------|---------------------|
| 2021-52 | 5 | | 2 | 7 | 28.6% | 28.6% |
| 2022-01 | 13 | 3 | 75 | 91 | 85.2% | 80.9% |
| 2022-02 | 3 | 10 | 227 | 240 | 98.7% | 92.7% |
| 2022-03 | 3 | 5 | 131 | 139 | 97.8% | 96.3% |
| 2022-04 | 1 | 3 | 51 | 55 | 98.1% | 98.0% |
| 2022-05 | 1 | 6 | 207 | 214 | 99.5% | 98.8% |
| 2022-06 | 1 | 1 | 99 | 101 | 99.0% | 98.5% |
| 総計 | 27 | 28 | 792 | 847 | | |

※1 判定不能は除く

3 ゲノム解析

当センターからの検体送付により国立感染症研究所にて実施されたゲノム解析と、当センターにて実施したゲノム解析のNextstrain Clade⁹⁾別の解析結果およびその概略を示す(図3、表5)。

各変異株の日本全国における香川県の割合は、日本人口における香川県人口の割合(およそ0.75%)が示す通り、おおむねその前後0.5%程度の数字となった。ただ、この中で0.1%にも満たない割合であったのが22A、22Dおよび23Aであった。香川県においてこれらの変異株は散発的に検出されただけで、同時期に流行した他の変異株に押される形であり流行しなかったのだと推察される。

表5 香川県で報告された変異株

| Nextstrain Clade | Pangolin lineage | WHOLabel | 香川県 報告数 | 日本全国 報告数 | 香川県の 割合 |
|---------------------|----------------------|----------|------------|-------------|------------|
| 19B | A | | 1 | 179 | 0.559% |
| 20A | B.1 | | 1 | 514 | 0.195% |
| 20B | B.1.1系統 | | 139 | 41004 | 0.339% |
| 20I | B.1.1.7系統 | Alpha | 513 | 51740 | 0.991% |
| 21J | B.1.617.2 およびAY系統 | Delta | 267 | 95571 | 0.279% |
| 21K | BA.1系統 | Omicron | 818 | 80167 | 1.020% |
| 21L | BA.2系統 | Omicron | 693 | 77689 | 0.892% |
| 22A | BA.4系統 | Omicron | 1 | 1621 | 0.062% |
| 22B | BA.5系統 | Omicron | 660 | 211437 | 0.312% |
| 22C | BA.2.12.1系統 | Omicron | 19 | 2374 | 0.800% |
| 22D | BA.2.75系統 | Omicron | 9 | 11625 | 0.077% |
| 22E | BQ.1系統 | Omicron | 38 | 17732 | 0.214% |
| 22F | XBB系統 | Omicron | 2 | 836 | 0.239% |
| 23A | XBB.1.5系統 | Omicron | 1 | 2883 | 0.035% |
| 23B | XBB.1.16系統 | Omicron | 3 | 1627 | 0.184% |
| 23C | CH.1.1系統 | Omicron | 2 | 1778 | 0.112% |
| 23D | XBB.1.9系統 | Omicron | 10 | 2047 | 0.489% |
| 総計 | | | 3177 | 600824 | 0.529% |

※ GISAID登録済データ(採取日2023.5.7まで)より取得



図3 Nextstrain Clade 別 検出状況

IV 考察

香川県では2020年3月に初めて陽性が確認されて以降陽性数はしだいに増加し第1波を形成後、増減を繰り返しながら第2波、第3波へと続いた。また、回数を重ねるごとに感染の波は大きくなっており、全国的にも同様の傾向であった。とくに第4波以降は感染性に寄与する変異株(アルファ株やデルタ株)の登場が陽性者数の増加に寄与していたと考えられている。そのため当センターでの検査件数もオミクロン株(BA.1系統)が登場した第6波が最も多く、陽性者数も最大であった。しかし、医療機関等での検査体制の充実や、抗原検査の普及、全数把握の運用の見直し等により、第7波以降は感染者数の増加に反し当センターでの検査件数は減少した。

また変異株探知のためのスクリーニング検査はリアルタイムPCRにより実施するため、即日結果を判定することができた。ゲノム解析により判断した推移とは大きな隔たりはなく、また次世代シーケンスよりも多くの検体を一度に検査できるため、数多くの検体を対象として置き換わりの推移のみを即日判断したい場合は有用な検査法と考えられる。

ゲノム解析では、各変異株の置き換わりの推移を正確に把握することができた。図3が示すように2022年11月以降は3種類以上の変異株が同一週に混在するような推移となっている。2種類のみが混在するような時期はスクリーニング検査でも変異株の推移をおおむね判断することができるが、このように複数の変異株が混在する時期においてはスクリーニング検査のみでは正確な推移が判断できない。更に様々な変異が蓄積し、今後複数の変異株が同時期に流行すると予想されるなかでは欠かせない検査となっていくと思われる。

V まとめ

検査件数は流行初期には月1500件程度(1日当たり50件)の検査件数であった。しかしその数も次第に増え、発生から1年を経過する頃には1日当たり300件近い検体数を検査できる体制を整え、月最大7500件程度(1日当たり250件)の検体を処理した。1日当たりの換算でも流行初期から比較して5倍以上の検体を処理することができた。

これは、当センターの微生物担当以外の職員や、他所属から駆け付けてくださった職員のご協力の賜物であり、ここに深謝します。

また、パンデミックにおけるリアルタイムでの全世界的なゲノム解析は新型コロナウイルスが初めての経験となった。パンデミックにおいてはある地方を起点とする変異株が数か月で一気に世界的に拡散していくことが、遺伝子配列情報から読みとくことができた。

あわせて遺伝子配列を読みとっていくとアルファ株に始まり、ほんの一部の変異が感染力や病原性に大きく影響したのは大変な驚きであった。ただオミクロン株などある時突然急激な変異を持ったウイルスがどのような経緯で登場したのかは判明しなかった。これは自然界の動物でウイルスが循環していたことや、免疫不全者の中で長期間に渡りウイルスが保持されていたなど諸説あるが、原因を探るためにはワンヘルスアプローチなど自然界全体を含めた包括的なゲノム解析手法を今後考えていく必要がある。

今回のパンデミックで得た教訓を今後新たな感染症発生に備えるための検査体制の構築にも活かしていきたい。

文献

- 1) 国立感染症研究所:病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1 (2020年3月19日版)
- 2) 国立感染症研究所:「感染研・地衛研専用」SARS-

- CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル Ver. 1.1
(2021年2月8日版)
- 3) タカラバイオ株式会社: Takara SARS-CoV-2 ダイレクトPCR 検出キット添付文書 (第6版), (2022)
 - 4) 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 (暫定版 v2.1.1) (2021年2月24日版)
 - 5) 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 L452R 変異の検出 (暫定版 v1.1) (2021年5月20日版)
 - 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) v1.4 (2022年1月27日版)
 - 7) GISAID, <https://gisaid.org> (2023/9/1 閲覧)
 - 8) 国立感染症研究所 実地疫学研究センター: 新型コロナウイルス感染症患者に対する積極的疫学調査実施要領 (2021年11月29日版)
 - 9) Nextstrain team: SARS-CoV-2 clade naming strategy for 2022
<https://nextstrain.org/blog/2022-04-29-SARS-CoV-2-clade-naming-2022> (2023/9/1 閲覧)