

徳島県における新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の行政検査について （初発から5類感染症移行まで）

徳島県立保健製薬環境センター

林 愛美・山本 瑞希・中川 菜美・後藤 賢且

SARS-CoV-2 Testing by the Government in Tokushima Prefecture (2020-2023)

Manami HAYASHI, Mizuki YAMAMOTO, Nami NAKAGAWA and Yoshikatsu GOTO

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2019年12月に中国湖北省武漢市で発生が報告された新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、短期間に世界各国で感染が拡大した。当センターでは、2020年2月10日より検査を開始し、2023年5月7日までに64,342検体のリアルタイムPCR検査を実施した。また、変異株への対応として、懸念される変異株（VOC）のスクリーニング（N501Y, L452R 及び G339D 検査）を実施した。さらに、当センターにおける行政検査で陽性となった検体の一部について、全ゲノム解析を実施し、本県におけるウイルス変異状況のモニタリング及び流行推移の把握に活用してきた。今回、当センターでの検査結果をまとめたので報告する。

Key words : COVID-19, SARS-CoV-2, リアルタイム PCR Real-time PCR, 次世代シーケンサー Next Generation Sequencer, 全ゲノム解析 Whole Genome Sequencing

I はじめに

COVID-19は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）を原因ウイルスとする感染症で、2019年12月に中国湖北省武漢市で発生して以来、世界中で感染が拡大した。日本では、2020年1月15日に国立感染症研究所の検査にて、初の感染者が確認され、本県においては、同年2月25日に当センターPCR検査にて感染者第1例目が確認された。

2020年2月1日からは感染症法上の「指定感染症」に指定され、翌年2月13日に「新型インフルエンザ等感染症」に位置づけられたことで、患者だけでなく無症状病原体保有者に対しても、法的根拠に基づく外出自粛要請等の措置がとられるようになった。2023年5月8日からは「5類感染症」に位置づけられたが、定点把握疾患となった現在でも、変異を繰り返しながら流行を続けている。

当センターでは、本県における感染状況及びウイルス変異状況を把握するため、SARS-CoV-2 遺伝子検出検査、変異株スクリーニング検査及び全ゲノム解析を実施してきた。今回、当センターでの検査結果をまとめるとともに、全国との比較を行ったので報告する。

II 方法

1 検体

リアルタイムPCR検査については、2020年2月10日から2023年5月7日までに搬入された64,342検体を対象とした。検体の種類は鼻咽頭拭い液、唾液及び喀痰等であった。N501Y, L452R, G339D検査及び全ゲノム解析については、当センターにおける行政検査で陽性となった一部の検体を対象とし、それぞれ393検体、572検体、288検体及び1,258検体の検査を実施した。

2 方法

(1) リアルタイム PCR

2020年2月10日より、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル²⁾に準拠し、リアルタイム RT-PCR 法 (Nセット及びN2セット) により検査を行った。なお、2020年4月23日以降はN2セットのみの検査系に切り替えている。また、同年6月9日にはダイレクト PCR 試薬である SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ) を用いた検査法を整備し、大量検体に対応可能な体制を整えた。さらに、翌年10月1日以降は全自動遺伝子検査装置コバス[®]6800 システム (Roche) を使用した検査を実施した。

(2) 変異株検出検査

懸念される変異株 (VOC) のスクリーニング検査として、2021年2月19日よりN501Y検査を実施し、同年6月8日よりL452R検査を実施した。また、翌年1月18日よりG339D検査を追加した。検査法は、国立感染症研究所の変異株検出マニュアル^{3,5)}に準拠した。

(3) ゲノム解析

2021年6月18日より、国立感染症研究所より貸与された MinION Mk1c (Oxford Nanopore Technologies) を使用した全ゲノム解析を開始し、翌年1月20日からは MiSeq (illumina) による解析を開始した。検査法は、国立感染症研究所のゲノム解析プロトコル⁶⁾に準拠した。なお、ゲノム解析開始以

前に採取された検体についても、適宜解析を行った。

III 結果及び考察

1 COVID-19 発生数及び発生数に占める行政検査の割合

本県と全国の COVID-19 検査陽性者の週別推移を図1に示す。全国では2023年第18週までに計8回のピークがあり、それぞれ第1波から第8波と呼ばれているが、本県では、第1波にあたるピークはなく、第2波以降に計7回のピークがあった。全国とほぼ同様の流行曲線を示しているが、ピークの時期は、第4波を除いて、全国よりも数週遅れる傾向にあった。第4波にあたる2021年4月中旬には、本県において医療機関や学校等での複数クラスターが発生し、全国に先行してピークを迎えた。

本県の発生数に占める行政検査陽性者数の割合の週別推移を図2に示す。流行初期である2020年第3週から第31週までは、当センターで全ての行政検査を実施した。その後、医療機関等でも検査が実施されるようになったものの、2021年末までは当センターでの行政検査が半数以上を占めていた。2022年前半の第6波では、第5波よりさらに多い、1日最大354検体の検査を実施したが、感染が急拡大し、抗原定性検査キットの供給も安定したことで、行政検査が占める割合は減少した。さらに、同年第30週以降は、積極的疫学調査の実施の判断が自治体に委ねられたことにより⁸⁾、大部分の検査が医療機関等で実施されるようになった。

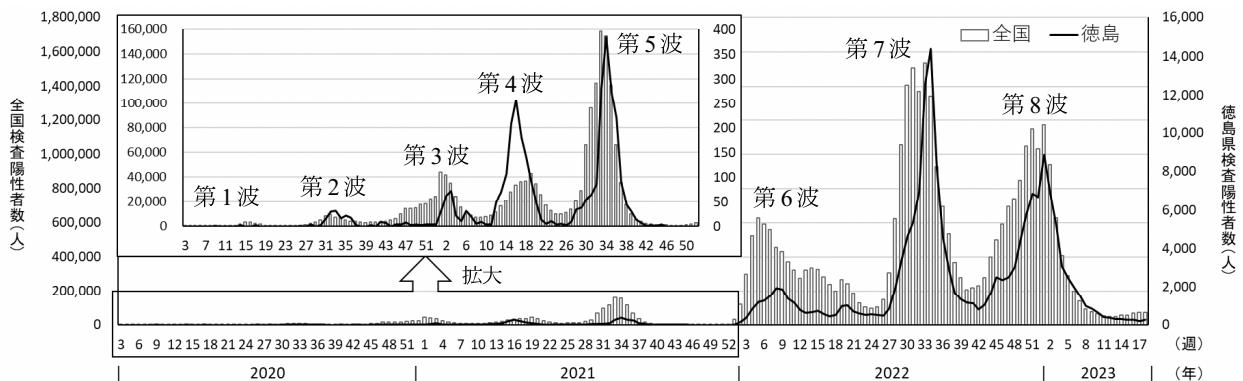


図1 本県及び全国の COVID-19 検査陽性者の週別推移 (2020年第3週から2023年第18週)

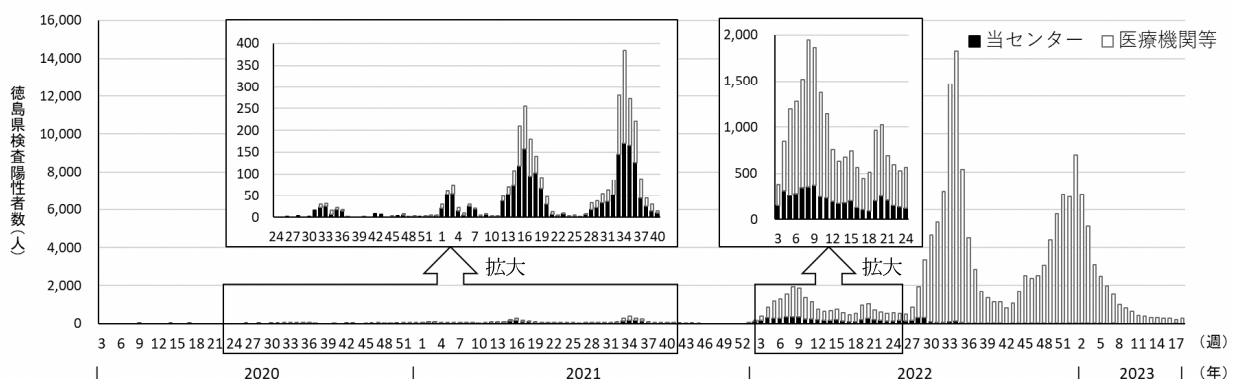


図2 本県の発生数に占める行政検査陽性者数の割合の週別推移 (2020年第3週から2023年第18週)

2 変異株 PCR 検査

当センターにおける変異株スクリーニング検査結果の週別推移を図3及び4に示す。なお、各変異は検査実施日を基準としてグラフに示した。国からの要請⁹⁾を受け、英国由来のアルファ株を中心としたN501Y変異を有する変異株のスクリーニングとして、2021年2月19日よりN501Y検査を開始し、同年6月14日まで実施した。検査開始当初は半数以上がN501Y変異を持たない株だったが、第13週以降はN501Y変異を有する株が急増し、第16週以降ではほぼ100%となった。

また、インドでデルタ株が急速な拡大を始め、国内でも2021年4月にデルタ株の第1例目が確認されると¹⁰⁾、N501Y変異株に代わり、L452R変異株スクリーニング検査が求められるようになった¹¹⁾。当センターでは、2021年6月8日から8月30日までL452R検査を実施し、第29週に初めてL452R変異を有する株を検出して以降、割合が増加し、第35週には、検査したすべての検体がL452R変異株であった。

オミクロン株については、国立感染症研究所によるリスク評価が11月28日付けで公表され¹²⁾、懸念される変異株(VOC)に指定されると、発生動向監視のため、変異株スクリーニング検査が求められるようになった¹³⁾。オミクロン株は、L452R変異を持たず、G339D変異を有している株が多いことから、当センターでは、2021年12月27日からL452R検査を再開し、翌年1月18日からはG339D検査を追加で実施した。2021年第52週のみL452R変異を有する株が検出されたが、翌年第1週以降は、全てL452R変異はなく、G339D変異を有する株が検出された。

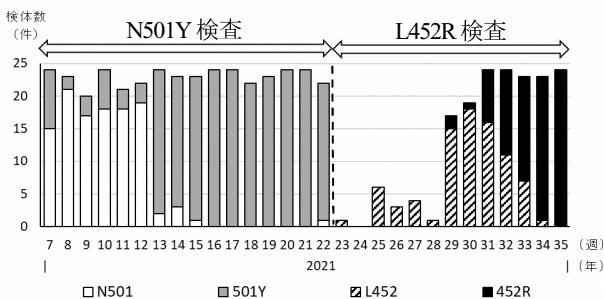


図3 N501Y及びL452R検査結果の週別推移

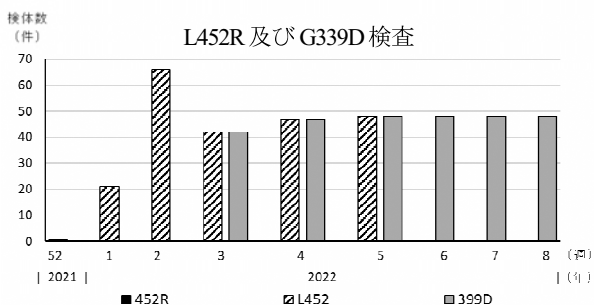


図4 L452R及びG339D検査結果の週別推移

3 ゲノム解析

国では2021年3月より、感染クラスターの早期特定と、感染リンクの断絶を目的として、国立感染症研究所にてSARS-CoV-2全ゲノム解析を実施している。COVID-19流行初期には、本県においても、SARS-CoV-2陽性検体の抽出RNAを国立感染症研究所へ送付し、ゲノム情報を得ていた。

当センターでは、2021年6月より、国立感染症研究所から貸与されたMinION Mk1cを使用し、ゲノム解析を開始した。翌年1月には、MiSeqによる解析を開始し、自施設でのゲノム解析体制の強化に務めた。ゲノム解析を開始した2021年6月から、COVID-19が5類感染症に位置づけられた2023年5月までの間、当センターでは1,258検体のゲノム解析を実施した。

全国及び当センターにおける全ゲノム解析にて検出されたPANGO系統の割合の週別推移をそれぞれ図5及び6に示す。なお、PANGO系統は検体採取日を基準としてグラフに示した。また、図6の空白部分については、当センターにおける行政検査にて陽性者がいなかったため、ゲノム解析は実施していない。

全国では、第4波にあたる2021年第16週には、英国由来のB.1.1.7(アルファ株)が全体の大部分を占めていた。第19週には第4波のピークを迎え、B.1.1.7が全体の9割以上を占めた。当センターでは、2021年第16週から第27週までに採取された検体は全てB.1.1.7であった。これは、ゲノム解析検体の選定時に、N501Y変異を有する株を優先して選択したためであると考えられる。

2021年第15週に、B.1.617.2の亜系統であるAY系統(デルタ株)が全国で初めて検出されて以降、急速にアルファ株との置き換わりが進行し、第31週には全体の約9割を占め、第5波の主流株となった。当センターでは全国より遅れた第28週に1例目のAY系統を検出し、第33週にはゲノム解析を実施した全ての検体がデルタ株に置き換わった。

2022年初頭からの第6波では、B.1.1.529の下位系統であるBA.1及びBA.2系統(オミクロン株)が主流となり、その後2023年5月まで継続してオミクロン株が検出されている。

2022年第17週にBA.5系統が全国で初めて検出されると、急速に置き換わりが進行し、第30週には全体の8割を占めた。BA.5系統の中でもBA.5.2系統が優勢であり、第7波の主流株となった。当センターにおいても、第27週にBA.5.2系統が初めて検出されると、2023年第8週まで検出され、その期間の大部分を占めた。2022年第29週以降は、全国の流行状況とは異なる結果となったが、これは当センターにおける検査数の減少に伴い、ゲノム解析数も減少したためであると考えられる。

2022年第45週以降の第8波では、多くの亜系統が発生し、中でもBA.2.75系統やBA.5.3の亜系統であるBQ.1系統が増加した。当センターでは、2022年第47週にBA.2.75系統を、同年第51週にBQ.1系統を初めて検出し、どちらも翌年まで継続して検出されたが、ゲノム解析数が少ないため、検出割合は全国と比較して異なる傾向を示した。

また、BJ.1 (BA.2.10 亜系統) と BM.1.1.1 (BA.2.75.3 亜系統) の組換え体である XBB 系統は、2022年第36週に全国で初めて検出されると、翌年第17週頃には全体の8割を占め、全国の主流株となった。当センターにおいては、2023年第

14週に初めてXBB系統を検出している。同年第18週時点では、XBB系統の中でもXBB.1.5系統及びXBB.1.16系統が優位であった。

当センターでのSARS-CoV-2全ゲノム解析結果は、概ね全国の流行推移と一致していたが、検出割合や主流株置き換わりの時期は異なる結果が示された。これは地域差やゲノム解析数の差が影響していると考えられる。

現在、COVID-19は5類感染症に位置づけられ、流行初期とは状況が変化したが、新たな変異のリスクを感知し、対応するために、ゲノムサーベイランスの継続が重要である。

全国

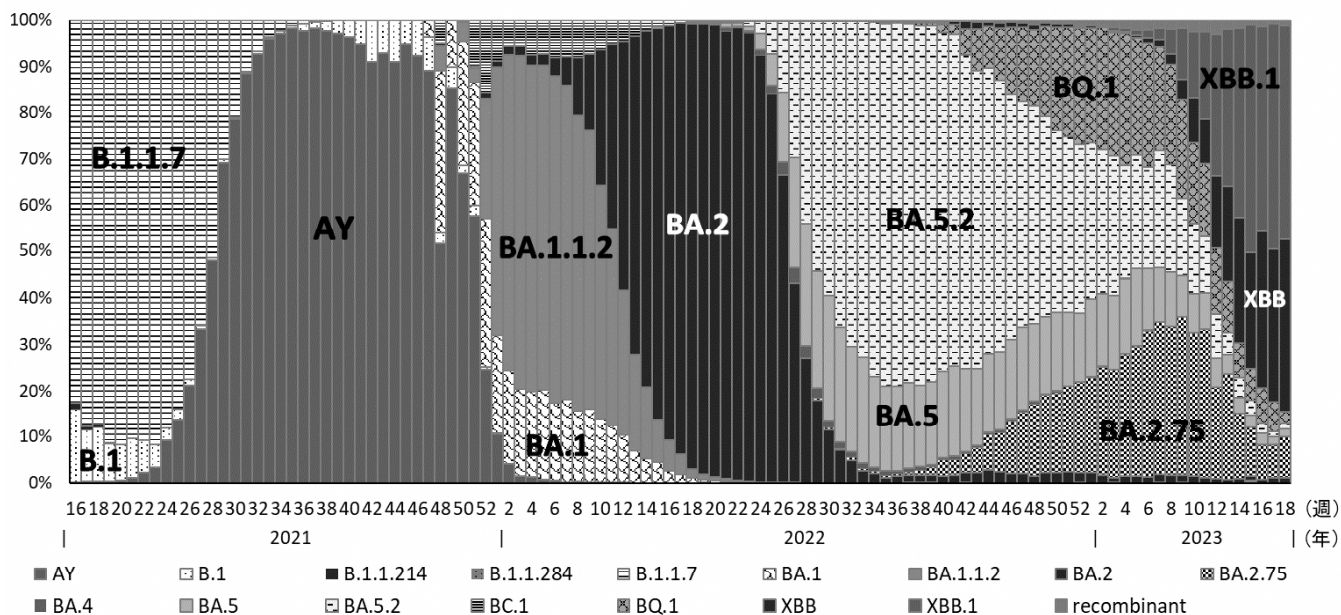


図5 全国で検出されたPANGO系統の割合の週別推移 (2021年第16週から2023年第18週)

徳島県

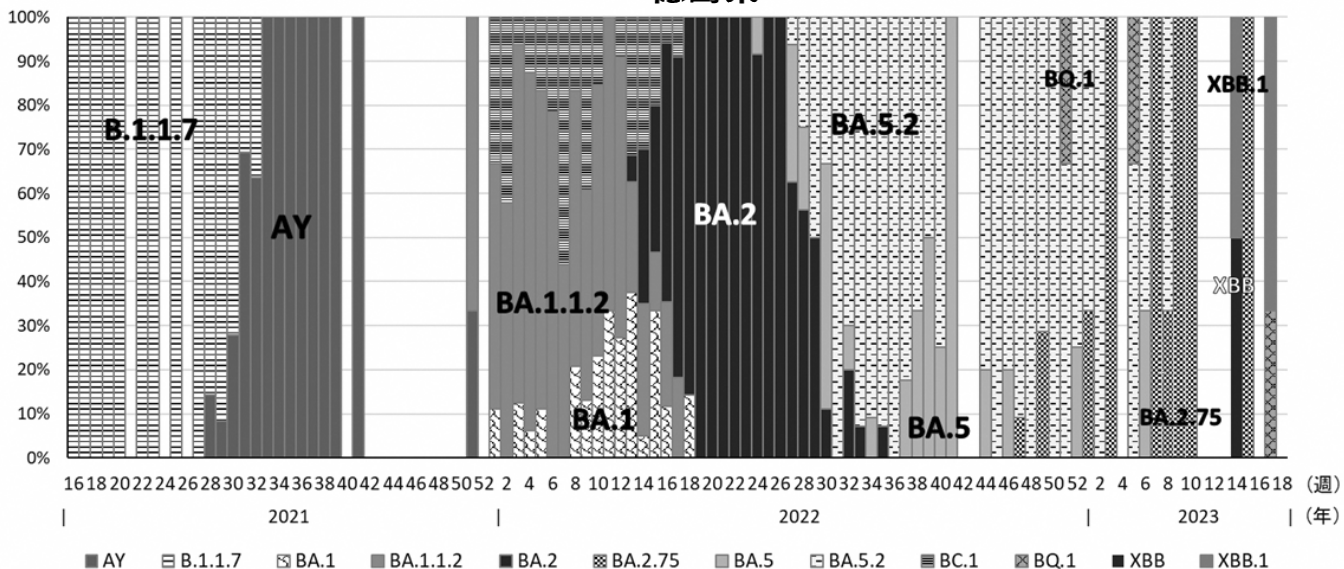


図6 当センターにおける全ゲノム解析にて検出されたPANGO系統の割合の週別推移 (2021年第16週から2023年第18週)

V まとめ

当センターでは、COVID-19 流行初期から SARS-CoV-2 遺伝子検査を開始し、変異株の発生動向を監視するため、変異株スクリーニング検査及び全ゲノム解析を実施してきた。

SARS-CoV-2 遺伝子検査では、主に病原体検出マニュアルに準拠した手法により、行政検査を実施する一方で、感染拡大に伴う検体数増加に対応するため、大量検体処理用のダイレクト RT-qPCR 法を整備し、1 日最大 360 検体の検査が実施可能な体制を整えた。また、全自動遺伝子検査装置コバス® 6800 システムの導入により、検査者の負担が軽減し、無理のない検査体制を持続できる環境となった。

変異株スクリーニング検査では、N501Y、L452R 及び G339D 検査を実施し、懸念すべき変異株 (VOC) の早期探知に努めた。また、変異株の発生動向を監視するため、変異株疑い検体については、優先的に全ゲノム解析を実施した。

SARS-CoV-2 は、感染と増殖を繰り返す中で、少しずつ変異している。そのため、現在の流行状況の把握及び新たな変異リスクに対応するため、ゲノムサーベイランス体制の構築が重要である。今後も引き続き、新たな知見の収集とともにゲノムサーベイランスを実施し、公衆衛生対策に貢献していきたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、全ゲノム解析についてご協力いただいた国立感染症研究所の関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省発表資料：新型コロナウイルスに関連した肺炎の患者の発生について (1 例目)，令和 2 年 1 月 16 日 (2020)
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.3，令和 2 年 2 月 5 日 (2020)
- 3) 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)，令和 3 年 1 月 21 日 (2021)
- 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 L452R 変異の検出 (暫定版 v2.1)，令和 3 年 6 月 7 日 (2021)
- 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 G339D 変異識別法，令和 3 年 12 月 23 日 (2021)
- 6) 国立感染症研究所：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Oxford Nanopore Mk1c & NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編 v1.0，令和 3 年 4 月 23 日

- (2021)
- 7) 国立感染症研究所：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル (Qiagen 社 QiaSEQ FX 編) v1.2，令和 3 年 9 月 17 日 (2021)
- 8) 厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部通知：B.1.1.529 系統 (オミクロン株) が主流である間の当該株の特徴を踏まえた感染者の発生場所毎の濃厚接触者の特定及び行動制限並びに積極的疫学調査の実施について，令和 4 年 3 月 16 日 (令和 4 年 7 月 30 日一部改正)，事務連絡 (2022)
- 9) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：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)，令和 3 年 2 月 5 日 (令和 3 年 3 月 31 日一部改正)，健感発 0205 第 4 号 (2021)
- 10) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報 (IASR) SARS-CoV-2 の変異株 B.1.617 系統の検出について，<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-lab-2/10326-covid19-43.html> (2024 年 7 月 30 日現在)
- 11) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：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)，令和 3 年 2 月 5 日 (令和 3 年 6 月 4 日一部改正)，健感発 0205 第 4 号 (2021)
- 12) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2 の変異株 B.1.1.529 系統 (オミクロン株) について (第 2 報)，<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10792-cepr-b11529-2.html> (2024 年 7 月 30 日現在)
- 13) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：新型コロナウイルス感染症の積極的疫学調査におけるゲノム解析及び変異株 PCR 検査について (要請)，令和 3 年 2 月 5 日 (令和 3 年 12 月 9 日一部改正)，健感発 0205 第 4 号 (2021)