

## 環境保健研究所における新型コロナウイルス検査対応について (2020 年 1 月～2023 年 5 月)

近藤 文、清水 幸恵、水村 綾乃、瀬野 智史、本宮 恵子、若岡 未記、  
野本 さとみ、吉原 純子、荒井 健二、横井 一、前嶋 寿

(環境保健研究所 健康科学課)

**要 旨** 2019 年 12 月に中国武漢市で初めて確認された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、2020 年 1 月に日本で初めての患者が確認され、同年 1 月 28 日に感染症法に基づく指定感染症に指定された。その後 2021 年 2 月 13 日の新型インフルエンザ等感染症への変更を経て 2023 年 5 月 8 日に 5 類感染症に移行し、感染対策などが緩和されたが、現在も感染拡大の波を繰り返している。当所では、2020 年 1 月 30 日から新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の検査を開始し、2023 年 5 月 8 日まで、61,666 検体の検査を実施した。また、2021 年 2 月の変異株検査に関する厚生労働省通知発出後は、変異株スクリーニング検査、全ゲノム解析を実施してきた。今回当所における SARS-CoV-2 の検査対応についてまとめたので報告する。

**Key Words** : 新型コロナウイルス, リアルタイム PCR 法, 変異株, 全ゲノム解析

### 1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、2019 年 12 月に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) によって引き起こされる急性呼吸器疾患である<sup>1)・2)</sup>。2020 年 1 月 15 日に日本で初めて患者が確認され、同年 1 月 28 日に感染症法に基づく指定感染症に指定された<sup>3)</sup>。2023 年 5 月 8 日に 5 類感染症に移行し、感染対策などが緩和されたが、現在も完全には収束していない。

当所では 2020 年 1 月 30 日から SARS-CoV-2 の遺伝子検査を開始し、2023 年 5 月 8 日に 5 類感染症に変更されるまで、61,666 検体の遺伝子検査を実施した。なお 5 月 8 日以降は、厚生労働省からの要請<sup>4)</sup>に基づき、ゲノムサーベイランスを実施している。検体は、インフルエンザ/COVID-19 定点である市内医療機関と市保健所から週 2 回程度搬入されている。

また、2020 年 12 月以降、英国および南アフリカで変異株が報告され、日本国内でも変異株による感染拡大が懸念されたことから、2021 年 2 月 5 日付けで厚生労働省から変異株による COVID-19 の発生状況の把握および早期対策を目的に変異株検査に関する通知<sup>5)</sup>が

発出された。当所では 2021 年 2 月 8 日からリアルタイム PCR 検査で陽性となった検体のうち、Ct 値が 30 以下となった検体を中心に、国立感染症研究所 (感染研) のマニュアルに基づき<sup>6)</sup>、N501Y 変異をターゲットとした変異株スクリーニング検査を開始した。その後変異株の流行状況に合わせ、L452R、G339D、T547K 変異 (全て Spike 領域) のスクリーニング検査を適宜実施した<sup>7)・8)・9)</sup>。

さらに、厚生労働省からの 2020 年 3 月 16 日付け協力依頼<sup>10)</sup>に基づき、リアルタイム PCR 陽性と判定された一部の検体の抽出 RNA を感染研に送付し、全ゲノム解析を実施していたが、当所においては、2021 年 10 月及び 2022 年 1 月に感染研主催の次世代シーケンサー (NGS) 技術研修に参加するとともに、全ゲノム解析専用 NGS として iSeq100 (イルミナ) を 2022 年 3 月に導入し、2022 年 4 月から、感染研の新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル<sup>11)</sup>に基づき、全ゲノム解析を開始した。

本稿では、2020 年 1 月から 2023 年 5 月までの当所における SARS-CoV-2 検査について報告する。

## 2. 材料及び方法

### (1) リアルタイム PCR 検査

2020年1月から2023年5月8日までに本市保健所および市内医療機関からCOVID-19が疑われて搬入された患者の臨床検体等61,666件（咽頭ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液等）を検査材料とした。

当所における初症例の検査は、2020年1月30日に武漢滞在歴のある患者と接触したというCOVID-19疑い症例についてであり、conventional RT-PCR法とシーケンス解析を実施し、感染研と検査データの検証を行い、市内初のCOVID-19陽性を確定した。

2020年2月からは、感染研の病原体検出マニュアル<sup>12)・13)・14)</sup>に基づき、リアルタイムPCR法で検査を行った。当初は臨床検体からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いてRNAを抽出し、抽出したRNAを鋳型にしてリアルタイムPCR法により検査を行っていたが、検体数の増加に伴い、2020年7月からRNA抽出が不要なダイレクトPCR法の一つであるSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (タカラバイオ)を導入した。このことにより、検査反応時間を約3時間から1時間に短縮することが可能となったため、一日の検査可能検体数を検査開始当初の32検体から376検体に引き上げた。

### (2) 変異株スクリーニング検査

ウイルスの感染性や抗原性の変化が懸念される変異株の早期探知を目的として、当時の変異株に共通して見られたN501Y変異(Spike領域)のスクリーニング検査について、2021年2月5日付けで厚生労働省から通知<sup>5)</sup>があり、2021年2月から、感染研のマニュアル<sup>6)</sup>に基づき、N501Y変異を持つB.1.1.7系統(アルファ株)を検出するN501Y変異スクリーニング検査を開始した。検査はリアルタイムPCR検査で陽性となった検体のうち、Ct値30以下の検体を中心に行った。2021年5月からは、L452R変異(Spike領域)をもつB.1.617.2系統(デルタ株)を検出するL452R変異スクリーニング検査を実施した。その後、2022年1月から、L452R変異を持たず、N501Y変異とG339D変異(Spike領域)をもつB.1.1.529系統(オミクロン株)を検出するためにG339D変異株スクリーニング検査を加えて実施した。さらに、2022年4月からオミクロン株の亜系統のBA.1、BA.2系統を判別するために、T547K変異スクリーニング検査を実施した。変異株スクリーニング検査については合計で3,145件となった。

### (3) 全ゲノム解析

厚生労働省からの2020年3月16日付け協力依頼<sup>10)</sup>を受け、当所で陽性となった検体のうち、Ct値27以下の検体からQIamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)により抽出したRNAを感染研に送付し、全ゲノム解析を実施した。また、2021年2月5日付け要請<sup>5)</sup>により、陽性検体の5~10%について、変異スクリーニング検査を実施した後、検体から抽出したRNAを2021年2月から感染研または千葉県衛生研究所あてに送付し、全ゲノム解析を実施した。

当所においては、2022年4月からゲノム解析を独自で実施し、2023年5月8日までに777検体について解析を行った。抽出RNAをLunaScript RT SuperMix Kit (NEB)を用いて逆転写し、98領域の(各約400bp長)のマルチプレックスPCR産物として増幅したものを、必要に応じAMPureXP (BeckmanCoulter)で精製後、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)によりライブラリー調整した。AMPureXPで精製後、iSeq100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。得られたデータを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<sup>15)</sup>により解析し、ゲノム配列及びPangolin (COVID-19 Lineage Assigner Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages) 系統<sup>16)</sup>を得た。

## 3. 結果

### (1) リアルタイム PCR 検査

2020年1月から2023年5月まで、リアルタイムPCR検査を計61,666件実施し、陽性は10,818件(17.5%)であった。(表1)

PCR検査実施件数及びSARS-CoV-2変異株の推移は第1~3波は従来株であり最大1,615検体/週、第4波はアルファ株であり最大622検体/週、第5波はデルタ株であり最大1,804検体/週、第6~8波はオミクロン株であり最大1,095検体/週であった(図1)。

表1 リアルタイムPCR検査実施件数

実施年	実施件数	陽性件数	陽性率(%)
2020年	20,232	1,440	7.1
2021年	26,288	3,678	14.0
2022年	14,158	5,377	38.0
2023年	988	323	32.7
合計	61,666	10,818	17.5

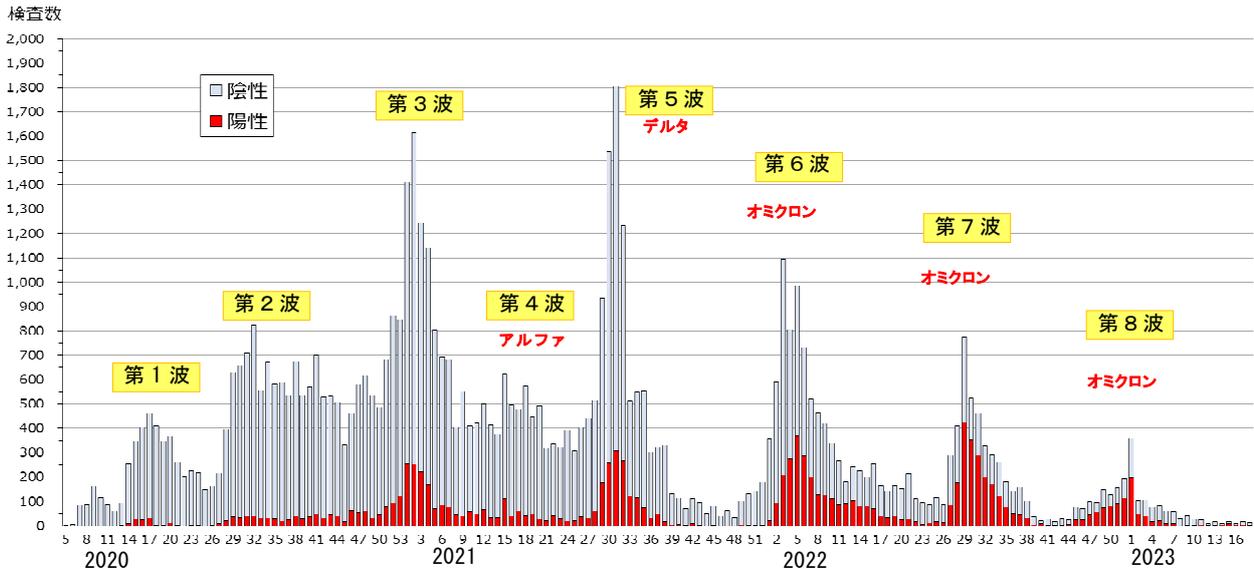


図1 PCR検査実施件数及びSARS-CoV-2変異株の推移

(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において、当所の検査結果では、第4波がアルファ株、第5波がデルタ株、第6波以降がオミクロン株と置き換わっており、これは全国的な流行状況と概ね一致していた。

変異株スクリーニング検査の実施及び検出状況は以下の通りである。

2021年は1,622件実施しN501Y変異株が257件及びL452R変異株が661件検出された。2022年は1,410件実施しN501Y変異株が8件、L452R変異株が630件、G339D変異株が934件及びT547K変異株が8件検出された。2023年は113件実施しL452R変異株が91件及びG339D変異株が87件検出された(表2)。

(3) 全ゲノム解析

感染研または千葉県衛生研究所にて実施したゲノム解析実施件数は442件であり、アルファ株が134件、デルタ株が169件、オミクロン株が104件及び解析不能が35件であった。

2022年4月から2023年5月までに当所で行った全ゲノム解析実施件数は777件であった(表3)。SARS-CoV-2変異株は2022年4月にはBA.2系統に置き換わっておりBA.2系統は2022年第26週まで主流

であった。2022年第27週からBA.5系統に流行が置き換わり、2023年第10週まで36週間にわたり主流株となっていた。また、2023年第11週よりXBB系統がBA.5系統の検出率を上回り、置き換わりが進んだ(図2)。SARS-CoV-2変異株の内訳は、BA.1系統が7件、BA.2系統が224件、BA.4系統が6件、BA.5系統が504件、XBB系統が21件、XBF及びXAKが各1件、型別不明が13件であった(表4)。

4. 考察

リアルタイムPCR検査の検体数は、アルファ株、デルタ株の流行していた2021年が26,288検体で最も多かった。2022年以降、オミクロン株が流行し、全国的に患者数が増えたが、当所に搬入される検体数は減少した。これは多くのSARS-CoV-2検査試薬の承認販売、臨時の登録衛生検査所の承認などにより、SARS-CoV-2

表3 全ゲノム解析実施件数

実施年	実施件数
2022年	634
2023年	143
合計	777

表2 変異株スクリーニング検査実施件数

実施年	実施件数	N501Y変異		L452R変異		G339D変異		T547K変異	
		N501 (従来株)	501Y (変異株)	L452 (従来株)	452R (変異株)	G339 (従来株)	339D (変異株)	T547 (従来株)	547K (変異株)
2021年	1,622	521	257	255	661				
2022年	1,410	3	8	753	630	20	934	406	8
2023年	113			21	91	0	87		
合計	3,145	524	265	1,029	1,382	20	1,021	406	8

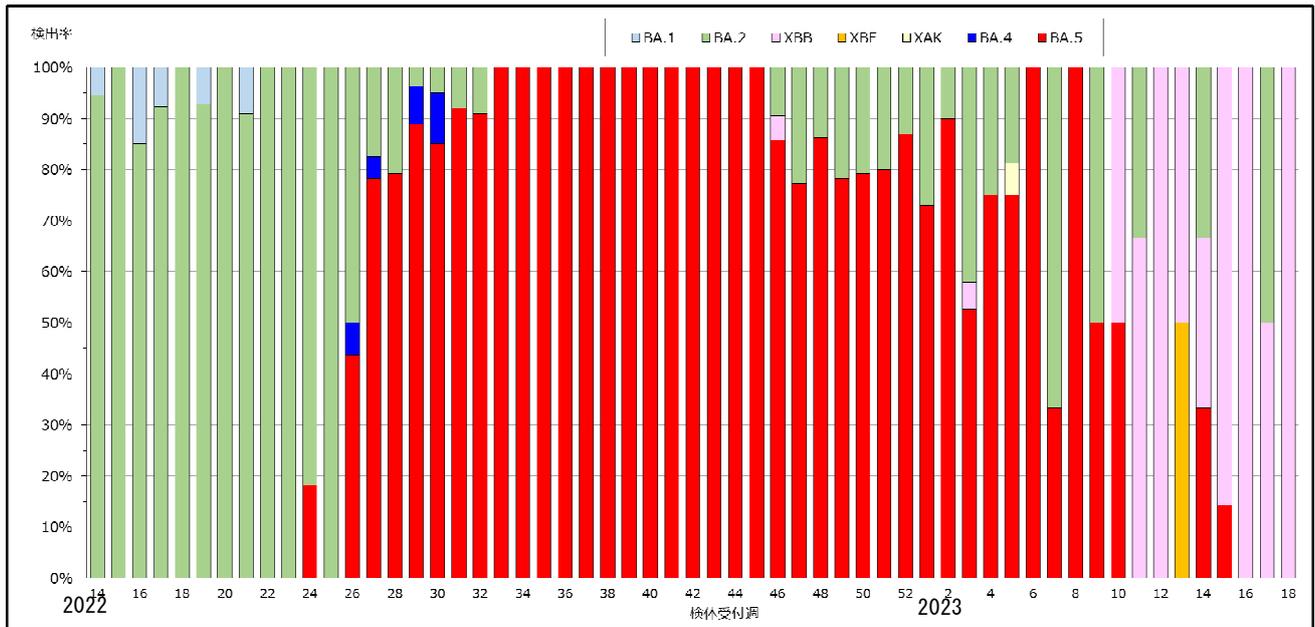


図2 SARS-CoV-2 変異株の割合

を検査できる機関が増加し衛生研究所への検査の集中が分散したこと、本市では2021年8月から患者の同居家族およびクラスター関連以外の行政検査が中止されたことが考えられる。

2021年2月から変異株スクリーニング検査により本市の変異株流行状況を疫学的にモニタリングしてきたことで、本市の変異株流行状況を把握することができ、全国的な流行状況と概ね一致していることが分かった。変異株スクリーニング検査は次世代シーケンサーよりも高感度かつ安価で、迅速かつ多検体処理が可能であり、本市における変異株のモニタリングにおいて果たしてきた役割は大きかった。

2022年4月からは当所で全ゲノム解析を独自で実施しており、市内で流行したSARS-CoV-2系統を詳細に解析することが可能となった。

第6波以降のオミクロン株は、当初BA.1系統が主流であったが、2022年4月にはBA.2系統に置き換わっておりBA.2系統は6月まで主流であった。7月からBA.5系統に流行が置き換わり、2023年2月まで8か月間にわたり主流株となっていた。BA.2.3系統は2022年11月から2023年2月まで、BA.2.75系統については、2022年11月から2023年4月までの間も検出された。2023年3月よりXBB系統がBA.5系統の検出数を上回り、置き換わりが進んだ。第6波から第8波にかけて全国的な感染者の顕著な増加と流行期間の長期化により本市においてもBA.2系統とBA.5系統の亜系統が多岐にわたって検出された。また、XBB系統はBJ.1系統(BA.2.10系統の亜系統)とBM.1.1.1系統(BA.2.75.3系統の亜系統)のSpike領域での組換え

系統であるが、本市ではBA.2.10系統の亜系統が2022年7月以降検出されていない。XBB系統は2022年の8月にインド、9月にシンガポール及び米国で検出されている<sup>17)</sup>。このことを考慮すると、2022年11月に本市で初めて検出されたXBB系統は海外から流入した可能性が示唆された。

BA.2系統は大きく17種類の亜系統に分類され、最も多く分類されたのはBA.2.3系統で70件、次いでBA.2で53件、BA.2.75系統で50件であった。

BA.5系統は大きく13種類の亜系統に分類され、最も多く分類されたのはBA.5.2系統で416件、次いでBA.5.3系統で51件、BA.5.1系統で18件であった。BA.5.2系統の内訳は、BA.5.2.1系統(孫系統のBF系統含む)が259件で最も多く、次いでBA.5.2系統が137件、BA.5.2.6系統が15件であった。

SARS-CoV-2の国際的な遺伝子情報データベースであるGlobal Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID)に登録された全国的な変異株検出状況と本市の検出状況を月ごとに比較してみると、BA.2系統では、概ね全国的な検出状況と一致していたが、BA.2.24系統及びBA.2.29系統における本市での流行状況は全国的な流行より1ヶ月程遅かった。このことから、BA.2.24系統及びBA.2.29系統は市外である程度流行した後、本市に流入している可能性が示唆された。また、BA.2.75系統は本市では11月以降2023年4月まで検出されており各月の検出率は全国の状況と比較し高かった。このことから、全国的な流行状況よりも市内での流行が長期にわたっており、本市内で流行が拡大していた可能性が示唆された。BA.5系統の本

表 4 SARS-CoV-2 変異株の内訳

(単位：件)

系統	亜系統・孫系統	2022年										2023年					合計
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月		
BA.1	BA.1.1	2														2	
	BA.1.1.2	2	3													5	
BA.2	BA.2	27	17	4	5											53	
	BA.2.1	1														1	
	BA.2.10	5	8	2	3											18	
	BA.2.10.1	2														2	
	BA.2.12.1			1	2											3	
	BA.2.13			1												1	
	BA.2.18				1											1	
	BA.2.2	1														1	
	BA.2.24		1	9	3	2										15	
	BA.2.29		1	3												4	
	BA.2.3	6	10	2					1		1					20	
	BA.2.3.1	19	18	3		1										41	
	BA.2.3.20								1	3			4			8	
	CM.1											1				1	
	BA.2.56			1	1	1										3	
	BA.2.71			1												1	
	BA.2.75													1		1	
	BM.1.1.1									1	1					2	
	BM.4.1.1								1	2	3					6	
	CH.1.1												1	1		2	
	BR.2									1	1					2	
	BN.1								7	9	5					21	
	BN.1.1										1					1	
BN.1.2										11	1	1	1		14		
BN.1.3.2											1				1		
BA.2.9	1														1		
BA.4	BA.4				3										3		
	BA.4.1				3										3		
BA.5	BA.5.1				6	7	1		1	2	1				18		
	BA.5.2			2	29	46	28	3	15	13	1				137		
	BA.5.2.1			3	37	18	8	2	6	15	6	3			98		
	BF.1				1										1		
	BF.2														1		
	BF.4					1	1		1						2		
	BF.5					27	33	5	19	17	10	2			113		
	BF.5.1											2	1		3		
	BF.7								2	9	10	1			22		
	BF.7.15										2	1			3		
	BF.7.4											1			1		
	BF.7.4.1										5				5		
	BF.8								1						1		
	BF.11								1		1				2		
	BF.11.5											2			2		
	BF.12								2						2		
	BF.21								1	1					2		
	BF.22									1					1		
	BA.5.2.6								2	6	5	2			15		
	BA.5.2.12									1					1		
	BA.5.2.18										1				1		
	BA.5.2.24										1				1		
	BA.5.2.32										1				1		
	BA.5.2.35										1				1		
	BA.5.3.1				1				1						2		
	BE.1				1										1		
	BQ.1								1			1			2		
	BQ.1.1								2	5	15	14	1		37		
	BQ.1.1.18											2	1		3		
	BQ.1.2													1	1		
	BQ.1.25													1	1		
	BE.4								1	1					2		
	BE.4.1										1	1			2		
BA.5.5			1	6	1	1		1	1	1				11			
BA.5.5.1								3	1	2				6			
BA.5.6							2							2			
XBB	XBB.1								1				4		5		
	XBB.1.5										1	1	5		7		
	XBB.1.9											1		1			
	XBB.1.9.1												6	1	7		
XBB.2													1	1			
recombinant	XBF													1	1		
	XAK											1			1		
	型別不明			2			2	4	3	2					13		
	合計	66	58	35	102	104	76	13	78	102	90	25	9	18	1	777	

市での流行状況は全国的な流行より早く、検出率増加のスピードも早かった。BA.5 系統の中でも BF.5 について、流入は全国的な流行状況より1ヶ月遅かったが、検出数のピークは1ヶ月早かった。このことから、本市は、都心部や国際空港に近いことにより変異株が流入し易い状況であった可能性及び都心との人の往来が多く感染拡大が起りやすい状況であった可能性が示唆された。XBB 系統の本市での流行状況は2023年3月、4月にピークを迎えており、概ね全国的な検出状況と一致していた。検査件数が少ないこと及び2022年11月7日以降の検体搬入は1医療機関に限られることから必ずしも本市の流行状況を正確に反映していないことに留意が必要であるが、全ゲノム解析を実施することである程度本市の流行状況を把握することが可能となった。

## 5. まとめ

2020年1月から2023年5月8日まで当所において新型コロナウイルス検査を実施した。リアルタイムPCR検査を61,666件、変異株スクリーニング検査を3,145件、全ゲノム解析を777件実施した。今後もSARS-CoV-2の新たな変異株や亜系統の出現が懸念される。当所では5月8日以降もリアルタイムPCR検査及び全ゲノム解析を継続しているが、引き続き全ゲノム解析を行い変異株の動向を注視していく必要がある。

謝辞：当所における新型コロナウイルス検査に携わっていただいた皆様に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Zhanwei Du, et al. Risk for Transportation of Coronavirus Disease from Wuhan to Other Cities in China, *Emerg Infect Dis*, 26, 2020, pp.1049-1052
- 2) Isaac I Bogoch, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel, *J Travel Med*, 27, 2020, pp.1-3
- 3) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症を指定感染症として定める等の政令, 政令第11号, 2020年1月28日
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課長：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）, 健感発0205第4号, 2021年2月5日, 2023年4月27日一部改正
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課長：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）, 健感発0205第4号, 2021年2月5日
- 6) 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 v1.1）, 2021年1月21日
- 7) 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
- 8) 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 変異の検出（暫定版 v1.1）, 2021年12月23日
- 9) Nobuhiro Takemae, et al. Development of New SNP Genotyping Assays to Discriminate the Omicron Variant of SARS-CoV-2, *Jpn J Infect Dis*, 2022 Jul 22;75 (4) :pp.411-414.
- 10) 厚生労働省健康局結核感染症課長：新型コロナウイルス感染症における積極的疫学調査について（協力依頼）, 健感発0316第3号, 2020年3月16日
- 11) 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）v1.4, 2022年1月27日
- 12) Kazuya Shirato, et al. Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2020 Jul 22;73 (4) ,pp.304-307.
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) PANGO Lineages, <https://cov-lineages.org/index.html> (2024年5月31日現在)
- 17) 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27報）