

新型コロナウイルスにおけるリアルタイムPCR検査、 変異株スクリーニング検査及びゲノム解析結果（2020年1月～2022年3月）

江原勇登 鈴木典子*1 大崎哲 青沼えり*2 篠原美千代 宮下広大 牧野由幸 川島都司樹 内田和江

Results of Real-time PCR test, variant screening test and genome analysis for SARS-CoV-2
(January 2020–March 2022)

Hayato Ehara, Noriko Suzuki, Satoshi Daisaki, Eri Aonuma, Michiyo Shinohara,
Kodai Miyashita, Yoshiyuki Makino, Toshiki Kawashima, Kazue Uchida

はじめに

2020年に中華人民共和国（中国）武漢市を中心に広がった新型コロナウイルス感染症は、その後様々な変異株が世界各国で確認されるとともに、日本国内にも流入し、大きな流行を引き起こした。新たな変異株の出現に伴い、変異株を確定するため次世代シーケンサー（NGS）による全ゲノム解析の必要性が高まっていった。2020年3月から国立感染症研究所の依頼¹⁾に基づき、リアルタイムPCR検査陽性検体の抽出RNAを国立感染症研究所に送付し開始したゲノム解析は、次世代シーケンサー（NGS）技術研修会の受講、新たなNGS（iSeq（Illumina））を導入することで体制整備を図り、2021年3月16日から当所で開始した。

また、2021年9月からは県内の3つの中核市（越谷市、川越市、川口市）の検体について、依頼検査によるゲノム解析を開始した。2022年1月以降は順次各中核市にて検査実施となり、解析結果を当所で収集した。さらに、2021年の12月からは、継続的に県内の変異株の流行状況の把握をするため、民間検査機関からも新型コロナウイルス陽性検体を収集した。

一方で、変異株感染者の早期検知を目的として変異株スクリーニング検査に関する通知²⁾が発出されたことから、当所において2021年1月からN501Y変異株スクリーニング検査を開始した。その後も新たに出現する変異株に対応するため、2021年5月にL452R変異を有するB.1.617.2系統（デルタ株）を検出するためのL452R変異株スクリーニング検査、L452R変異のないB.1.1.529系統（オミクロン株）を検出するためのL452R変異株スクリーニング検査、2022年3月にはT547K変異のないBA.2系統（オミクロン株）を検出するためT547K変異株スクリーニングを開始した。

新型コロナウイルスにおける陽性率、変異株の流行状況については、対象とする地域、時期により大きく異なり³⁾、広域的な感染防止措置や日常的な感染防止対策に活用するためにも、県内の発生の動向や推移を把握することは非常

に重要である。本調査では前述の経緯のもと、2021年度までに県内で新型コロナウイルスを疑う症状を発症した患者検体のリアルタイムPCR検査、変異株スクリーニング検査、ゲノム解析による主流系統の推移をまとめたので報告する。なお、2020年度の検査状況については、埼玉県衛生研究所報55号⁴⁾にて報告しているところであるが、N501Y変異株スクリーニング検査は2020年度及び2021年度をとおして実施していること、新型コロナウイルスの流行の波と変異株の発生状況の関係を説明するにあたり、2021年度以前の結果抜きでは困難であることから、本報告は2021年度までの全ての検査結果を含めた。

材料及び方法

1 リアルタイムPCR検査

2020年2月から2022年3月までに、新型コロナウイルス感染症が疑われて当所に搬入された患者の臨床検体56,163件（咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液、気管支肺胞洗浄液）をウイルス検査の材料とした。リアルタイムPCR検査は、病原体検出マニュアル⁵⁾に準じた方法、またはSARS-CoV-2ダイレクトPCR検出キット（タカラバイオ）を用いて、添付の取扱説明書⁶⁾に従って実施した。

2 変異株スクリーニング検査

当所のリアルタイムPCR検査で陽性になった検体及び2021年12月からは民間検査機関で陽性となった検体で、Ct値が30以下となった合計1,727検体を検査対象とし、ウイルス蛋白質の特定アミノ酸の変異（N501Y, L452R, T547K）を検出するための変異株スクリーニング検査を行った。

2021年1月25日から6月14日に採取された検体はB.1.1.7系統（アルファ株）を検出するN501Y変異株スクリーニング検査、2021年5月15日から10月21日に採取された検体はB.1.617.2系統（デルタ株）を検出するL452R

*1 現 食肉衛生検査センター *2 現 感染症対策課

表1 リアルタイムPCR検査の状況 (n=56,163)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
2019年度	検体数	—	—	—	—	—	—	—	—	—	188	956	1,144
	陽性数	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	67	69
	陽性率(%)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	7.0	6.0
2020年度	検体数	2,468	1,687	690	2,208	3,157	1,982	2,771	4,976	5,174	4,844	2,402	25,775
	陽性数	339	36	17	88	147	45	133	227	411	433	232	191
	陽性率(%)	13.7	2.1	2.5	4.0	4.7	2.3	4.8	4.6	7.9	8.9	9.7	7.4
2021年度	検体数	2,671	2,507	1,316	3,554	2,860	975	375	171	892	2,677	1,278	809
	陽性数	182	156	42	174	284	62	12	1	17	495	346	175
	陽性率(%)	6.8	6.2	3.2	4.9	9.9	6.4	3.2	0.6	1.9	18.5	27.1	21.6

変異株スクリーニング検査, 2021年11月29日以降に採取された検体はL452R変異がないB.1.1.529系統(オミクロン株)を検出するためのL452R変異株スクリーニング検査を開始した。さらに, 2022年3月11日以降に採取された検体からはオミクロン株の亜系統の一つであるBA.2系統を検出するT547K変異株スクリーニング検査を行った。検体から抽出したRNAを鋳型にし, SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit(タカラバイオ)またはQuantiTect Probe RT-PCR kit(QIAGEN)によりリアルタイムRT-PCRを行った。PCR反応条件及びプライマーおよびプローブは検出マニュアル^{7) 8) 9)}に従った。

3 ゲノム解析

2021年1月以降の変異株スクリーニング検査対象検体に加え, 中核市から依頼検体の合計2,871検体について, ゲノム解析を行った。抽出RNAをLunaScript RT SuperMix Kit(NEB)を用い逆転写した後, Q5(NEB)を用いたマルチプレックスPCRを行い, QIAseq FX DNA Library Kit(QIAGEN)によりライブラリーを調整した。AMPureXP(BeckmanCoulter)で精製後, MiSeq(Illumina)あるいはiSeq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。得られたデータは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¹⁰⁾によりゲノム配列及びPangolin(COVID-19 Lineage Assigner Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)系統¹¹⁾を得た。この結果に加え, 当所でゲノム解析を開始する以前の国立感染症研究所依頼検体, 2021年11月からさいたま市の実施検体, 2022年1月以降は3つの中核市の実施検体を加えた合計3,684検体について, 発症日を元に1週間ごとにPangolin系統別検体数を集計した。

結果

1 リアルタイムPCR検査

2020年2月から2022年3月までの採取月ごとの新型コロナウイルス検出状況を表1に示した。2019年度は1,144検体中, 69検体(6.0%), 2020年度は34,934検体中, 2,299検体(6.6%), 2021年度は20,085検体中, 1,946検体(9.7%), 全体で56,163検体中, 4,314検体(7.7%)から新型コロナウイルスが検出された。月別に見ると, 検体数は2020年12月が5,174検体(うち陽性は411検体)と最多であり, 陽性率は2022年2月の27.1%(1,278検体中346検体が

陽性)が最も高かった。

2 変異株スクリーニング検査

(1) アルファ株を検出するN501Y変異株スクリーニング検査

B.1.1.7系統(アルファ株)を検出するN501Y変異株スクリーニング検査の判定月ごとの結果を表2に示した。合計586検体を検査し217検体(37.0%)が陽性(501Y)であった。陽性率は2021年1月から3月にかけて減少するものの, 4月は上昇に転じ, 6月は92.9%(14検体中13検体陽性)まで増加した。

表2 アルファ株を検出するN501Y変異株スクリーニング検査(n=586)

2021年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	計
陽性(501Y)	11	19	7	81	86	13	217
陰性(501N)	59	134	118	37	13	1	362
判定不能	3	1	3				7
陽性率(%)	15.1	12.3	5.5	68.6	86.9	92.9	37.0

(2) デルタ株を検出するL452R変異株スクリーニング検査

B.1.617.2系統(デルタ株)を検出するL452R変異株スクリーニング検査の判定月ごとの結果を表3に示した。合計410検体を検査し277検体(67.6%)が陽性(452R)であった。5月には検出されなかったものの, 6月以降陽性率が上昇した。

表3 デルタ株を検出するL452R変異株スクリーニング検査(n=410)

2021年	5月	6月	7月	8月	9月	10月	計
陽性(452R)		8	55	174	32	8	277
陰性(452L)	29	24	59	17	1		130
判定不能	1	2					3
陽性率(%)	0	23.5	48.2	91.0	97.0	100.0	67.6

(3) オミクロン株を検出するL452R変異株スクリーニング検査

B.1.1.529系統(オミクロン株)を検出するL452R変異株スクリーニング検査の判定月ごとの結果を表4に示した。778検体を検査し619検体(79.6%)が陽性(452L)であった。また, 12月の陽性率は3.7%であり, 1月には84.9%と上昇し, 2, 3月には判定不能を除き全て陽性であった。

表4 オミクロン株を検出するL452R変異株スクリーニング検査(n=778)

	2021年12月	2022年1月	2月	3月	計
陽性(452L)	3	438	124	54	619
陰性(452R)	57	49			106
判定不能	22	29	1	1	53
陽性率(%)	3.7	84.9	99.2	98.2	79.6

(4) オミクロン株 BA.2 系統を検出する T547K 変異株スクリーニング検査

BA.2 系統 (オミクロン株) を検出する T547K 変異株スクリーニング検査の判定週ごとの結果を表 5 に示した。38 検体を検査し 16 検体 (42.1%) が陽性 (T547) であった。経時的に陽性率が増加した。

表5 オミクロン株BA.2系統を検出するT547K変異株スクリーニング検査(n=38)

2022年	3/11-3/17	3/18-3/24	3/25-3/31	計
陽性(547T)	5	5	6	16
陰性(547K)	15	5	2	22
陽性率(%)	25	50	75	72.7

3 ゲノム解析

当所, 国立感染症研究所, 及び中核市でゲノム解析を実施した 3,684 検体のうち 3,400 検体について良好なゲノムデータ (Coverage95%以上, Total read 10,000 以上) が得られ, 39 種の Pangolin 系統に分類された。3,400 検体の内, 変異株は多い順に, B.1.1.529 系統 (オミクロン株) が 1,356 検体 (BA.1 系統 1,277 検体, BA.2 系統 79 検体), B.1.617.2 系統 (デルタ株) が 589 検体, B.1.1.7 系統 (アルファ株) が 275 検体, R.1 系統が 146 検体, P1 系統 (ガンマ株) が 13 検体, B.1.351 系統 (ベータ株) が 1 検体であった (表 6)。また, 上記以外では多い順に, B.1.1.214 系統が 381 検体, B.1.1 系統が 342 検体, B.1.1.284 系統が 217 検体, B.1 系統が 18 検体であった。なお, B.1.351 系統 (ベータ株) 以外の 10 検体未満の系統はその他に含めた。また, 良好なゲノムデータが得られた 3,400 検体のうち, 発症日の判明した 2,625 検体について, 系統の検出数を週ごとにまとめ, 県内流行における主流系統の推移を調べた (図 1)。なお, 流行の拡大状況¹²⁾により, 第 1 波を 2020 年 2 月 1 日から 6 月 9 日, 第 2 波を 6 月 10 日から 9 月 13 日, 第 3 波を 9 月 14 日から 2021 年 2 月 22 日, 第 4 波を 2 月 23 日から 6 月 10 日, 第 5 波を 6 月 11 日から 12 月 14 日, 第 6 波を 12 月 15 日から 2022 年 3 月 31 日とした。

第 1 波のピーク時 (2020 年 4 月 1 日~4 月 7 日) は B.1.1 系統が 90.3% (93 検体中 84 検体), 第 2 波のピーク時 (2020 年 7 月 29 日~8 月 4 日) は B.1.1.284 系統が 100% (7 検体全て),

第 3 波のピーク時 (2020 年 12 月 30 日~2021 年 1 月 5 日) は B.1.1.214 系統が 76.0% (25 検体中 19 検体), 第 4 波のピーク時 (2021 年 5 月 5 日~11 日) は B.1.1.7 系統 (アルファ株) が 76.2% (21 検体中 16 検体), 第 5 波のピーク時 (2021 年 8 月 11 日~17 日) は B.1.617.2 系統 (デルタ株) が 98.6% (70 検体中 69 検体), 第 6 波のピーク時 (2022 年 2 月 2 日~2 月 8 日) は BA.1 系統 (オミクロン株) が 95.5% (111 検体中 106 検体) をそれぞれ占めており, 各波における主流系統は波ごとに異なっていた。

表6 新型コロナウイルスゲノム解析結果(2020年2月~2022年3月)

Pangolin系統	検体数	発症日(情報があるもののみ)
B.1	18	2020年3月5日~2021年4月24日
B.1.1	342	2020年3月23日~2021年5月5日
B.1.1.214	381	2020年6月24日~2021年4月30日
B.1.1.284	217	2020年6月5日~2021年3月9日
B.1.1.7(アルファ株)	275	2021年1月20日~9月2日
B.1.351(ベータ株)	1	2021年3月2日
P.1(ガンマ株)	13	2021年2月16日~2月26日
R.1	146	2021年2月1日~6月4日
B.1.617.2(デルタ株)	589	2021年6月2日~2022年2月5日
BA.1(オミクロン株)	1,277	2021年12月18日~2022年3月22日
BA.2(オミクロン株)	79	2022年1月4日~3月27日
その他	62	2020年2月28日~2021年3月26日
解析不能	284	2020年2月19日~2022年3月13日
合計	3,684	

考察

全国的に第 1 波から第 6 波と呼ばれる新型コロナウイルス感染症の大きな流行が見られたが, それに合わせて当所にも多数の新型コロナウイルス疑い検体が搬入された。陽性率については, 2022 年 2 月が最も高く, BA.1 系統 (オミクロン株) の流行ピーク時期とほぼ一致した。

変異株スクリーニング検査は, 時間が経過するとともに陽性率が上昇していった。変異株スクリーニングで最初に変異が検出されてから陽性率が 80% になるまでに, B.1.1.7 系統 (アルファ株) を検出する N501Y 変異株スクリーニング検査は約 4 か月, B.1.617.2 系統 (デルタ株)

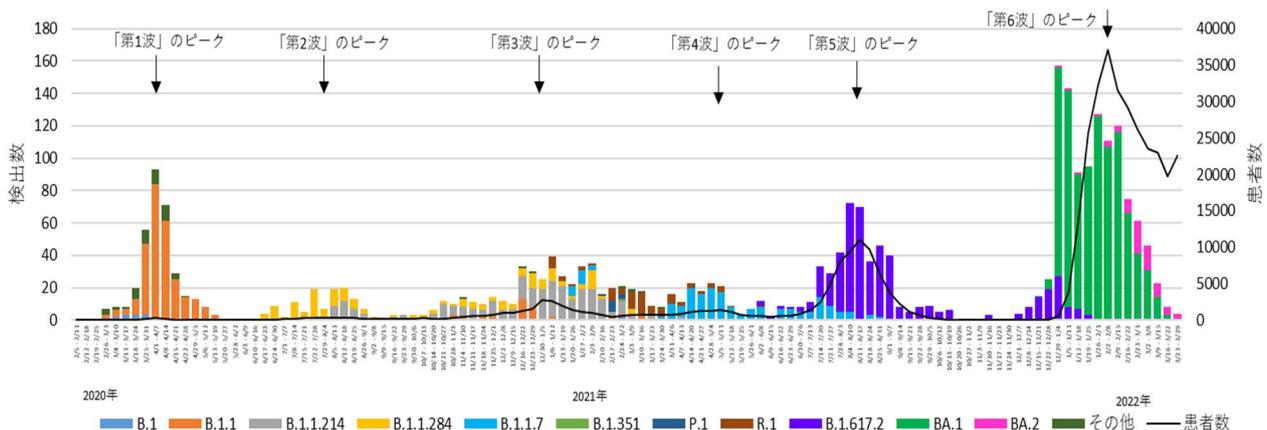


図1 新型コロナウイルスの系統別検出数(n=2,625)

を検出する L452R 変異株スクリーニング検査は約2か月、B.1.1.529 系統（オミクロン株）を検出する L452R 変異株スクリーニング検査では約1か月であったことから、B.1.1.529 系統（オミクロン株）は、短期間で広がったことが示唆された。

ゲノム解析の結果から、第1波はB.1.1系統、第2波はB.1.1.284系統、第3波はB.1.1.214系統、第4波はB.1.1.7系統（アルファ株）、第5波はB.1.617.2系統（デルタ株）、第6波はBA.1系統（オミクロン株）が大半を占めており、各波における主流系統は波ごとに異なっていた。流行の波はそれまで検出されてこなかった新しい変異株が引き起こしていたことから、今後も新たな変異株が発生するごとに流行の波を引き起こすことが想定された。また、変異株の検出状況は概ね全国と同様の経時的推移が認められた¹³⁾。

今後も新たな変異株の出現に迅速に探知対応し、変異株感染拡大抑制に繋がるよう海外や国内の変異株の情報の収集や検査、解析技術の研鑽に日ごろから努める必要があると考える。

文献

- 1) 国立感染症研究所：検体 RNA の譲渡申請書（令和2年3月8日）
- 2) 厚生労働省：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 令和3年2月5日
- 3) 厚生労働省：第79回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザリーボード（令和4年4月6日）資料1 直近の感染状況等の分析と評価 p2
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000926435.pdf>（2022年6月28日現在）
- 4) 江原勇登，篠原美千代，鈴木典子，他：新型コロナウイルスにおけるリアルタイム PCR 検査，変異株スクリーニング検査及びゲノム解析結果，埼玉県衛生研究所報，55，82-84，2021
- 5) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV 令和2年2月5日
- 6) SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit
https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/rc30jw_j.pdf（2022年6月29日現在）
- 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 N501Y 変異の検出 令和3年2月19日
- 8) 国立感染症研究所：L452R 変異検出マニュアル（ver.1.1） 令和3年5月21日
- 9) JDevelopment of new SNP genotyping assays to discriminate the Omicron variant of SARS-CoV-2, JJID, 2022-007. R2.
- 10) 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

- 11) PANGO Lineages,
<https://cov-lineages.org/index.html> (2022年6月29日現在)
- 12) 埼玉県衛生研究所感染症疫学情報センター：COVID-19（新型コロナウイルス感染症）の流行情報
<https://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/surveillance/covid-19.html>（2022年6月28日現在）
- 13) 厚生労働省：第80回新型コロナウイルス感染症対策アドバイザリーボード（令和4年4月13日）資料4 新型コロナウイルス感染症（変異株）への対応 p5
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/00092886.pdf>（2022年6月28日現在）