

リアルタイムPCR法を用いたSARS-CoV-2変異検出法の検討

長島 真美^a, 熊谷 遼太^b, 河上 麻美代^b, 浅倉 弘幸^b, 林 真輝^b, 永野 美由紀^b, 山崎 貴子^b, 矢尾板 優^b,
北村 有里恵^b, 長谷川 道弥^b, 藤原 卓士^b, 三宅 啓文^b, 千葉 隆司^c, 鈴木 淳^b, 貞升 健志^a

2019年12月に中国で最初に確認された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, 2021年に入っても世界的流行が続いている. その原因の多くは免疫からの逃避や感染性・伝播性が増加した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の変異株による感染拡大で, これら変異株の多くはスパイクタンパク質遺伝子に特徴的な遺伝子変異 (アミノ酸変異) を有している. 本研究では変異株に特徴的なアミノ酸変異 (N501Y, del 69-70, E484K/QおよびL452R/Q変異等) を迅速に検出するリアルタイムPCR法を構築した. この方法を用いることで, 感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株に分類されるウイルスを短時間で大量に検査することが可能となり, 都内の感染状況を迅速に把握することが期待できる.

キーワード: 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2), 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19), リアルタイムPCR法, 変異株, VOC, VOI, N501Y, E484K/Q, L452R/Q

はじめに

2019年12月に中国湖北省武漢市で最初に確認された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, 現在も世界的流行が続き, 未だ収束がみえていない. 2020年の終わりには感染性・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株が出現し, 世界中がその動向を注視している¹⁻⁴⁾.

COVID-19の原因ウイルスである新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は 約29,900塩基の RNA ウイルスである. 遺伝子変異に対する修復機能を持つため, インフルエンザウイルスやHIVに比べ安定的⁵⁾で, 遺伝子に変異が入る割合は1 か月に 2 塩基程度と推定されている⁶⁾. SARS-CoV-2のスパイクタンパク質は, ウイルスの表面を覆うように存在し, 受容体であるヒトの細胞表面にあるアンギオテンシン変換酵素 II (Angiotensin-converting enzyme2: ACE II) に結合する. ACE II に結合することで細胞への侵入が始まるため, SARS-CoV-2のスパイクタンパク質の変異によっては感染性の増強や免疫逃避を起こす可能性がある. そのため, SARS-CoV-2のゲノム解析が世界中で行われ, 得られた配列情報は Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID: <https://www.gisaid.org/>)⁷⁾ に登録され, 国際的にゲノム情報の共有化が図られている.

SARS-CoV-2の全ゲノム配列の解析は, 次世代シーケンサー (NGS) により行われている. 検体中に多くのウイルスが含まれていれば全領域の塩基配列が得られ⁸⁾, 得られた塩基配列情報はウイルスの分子疫学解析等に広く利用されている⁹⁻¹¹⁾. しかし, NGS解析には数日に渡る複数の工程があり, 出力されるデータは膨大なため解析にも時間を要し, 1件当たりのコストは高い. 早い段階で変異株の

感染を確認し, 感染拡大の防止策に役立てていくためには, 迅速に変異株か否かを把握することが重要である. これまで, 著者らは, 季節性インフルエンザウイルスの薬剤耐性変異を迅速に調べる方法としてリアルタイムPCR法を用いた検出法を構築してきた¹²⁻¹⁴⁾. 今回, 季節性インフルエンザウイルス薬剤耐性変異の検出法を応用し, SARS-CoV-2の変異の検出法を開発し検討したので報告する.

材料および方法

1. 供試試料

real-time PCR法用の標準DNAとして, 表1に示すように, 各々のターゲットとなる部分の遺伝子領域に設定したプライマーおよびプローブの塩基配列を含む合成鎖DNA (14領域) を作製した (ファスマックに合成依頼). 凍結乾燥品をTE溶液 (10 mM Tris-HCl, pH8.0; 1 mM EDTA, pH8.0) (ナカライテスク) で溶解後, 10倍段階希釈を行い, 3.0×10^3 copies/ μ L を検出系の陽性コントロールとした.

2020年1月以降に積極的疫学調査事業の一環で搬入されたCOVID-19患者 (疑いを含む) の臨床検体 (鼻咽頭ぬぐい, 唾液等) から抽出されたRNAを対象とした.

2. real-time PCR法

長島ら^{12,13)}および 熊谷ら¹⁴⁾の抗インフルエンザ薬の耐性変異検出法を参考に, 標的遺伝子を検出するプライマーおよび TaqMan MGB プローブを設定した (表1). プライマーおよびプローブの設定には, Primer Express v.3.0.1 (サーモフィッシャー) を用いた.

^a 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^c 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

表1. リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ

検出領域	検出対象	名前	塩基配列 (5'→3')	位置	備考
orf1ab	t8782c	orf1a_S2839S	orf1ab_8746-F	TGCTAACAAACATGCTGATTTTGAC	8,746-8,822
			orf1ab_8822-R	TGGGCAAGCTTTGTCATTAGTATAAC	
			orf1ab_8773-PcL	FAM-ATGGTTTAGcCAGCGTG-MGB	
			orf1ab_8773-PtS	VIC-ATGGTTTAGtCAGCGTGG-MGB	
orf1ab	c14408t	orf1b_P314L	orf1ab_14408-F	TTCTGCATTGTGCAAACCTTAATG	28,101-28,184
			orf1ab_14408-R	AAACTACAAATGGAACACCATCAACA	
			orf1ab_14408-Pc	FAM-GTTCCACcTACAAGT-MGB	
			orf1ab_14408-Pt	VIC-GTTCCACTtACAAGTT-MGB	
S	a23403g	S_D614G	S_23403-F	CCAGGAACAAATACTTCTAACCAGG	23,360-23,438
			S_23403-R	CATGAATAGCAACAGGGACTTCTG	
			S_23403-Pa	VIC-CTTTATCAGGaTGTTAACTG-MGB	
			S_23403-Pg	FAM-TTTATCAGGgTGTTAACTG-MGB	
ORF3a	g25563t	ORF3a_Q57H	ORF3_25563-3F	TGGCGTTGCACCTTCTTGCT	25,536-25,600
			ORF3_25563-3R	GCCATCTCTTTTTGAGGGTTATGA	
			ORF3_25563-3Pg	FAM-TTTTTCaAgAGCGCTTC-MGB	
			ORF3_25563-3Pt	VIC-TTTTTCaAtAGCGCTTCC-MGB	
ORF3a	g26144t	ORF3a_G251V	ORF3_26144-F	GCCTGAAGAACATGTCCAAATTC	26,109-26,193
			ORF3_26144-R	CGGTTTCATATAAATTGGTTCCA	
			ORF3_26144-Pt	FAM-ATCGACGtTTCATCCG-MGB	
			ORF3_26144-Pg	VIC-ATCGACGgTTCATC-MGB	
ORF8	c28144t	ORF8_S84L	ORF8_28101F	CCCATTCAAGTACATCGATATCGG	28,101-28,184
			ORF8_28184R	ACTACCAATTTAGGTTCTGGC	
			ORF8_28135PtL	FAM-TTTCCTGTTtACCTTTTAC-MGB	
			ORF8_28135PtS	VIC-TTTCCTGTTcACCTTTTA-MGB	
N	g28881a g28882a g28883c	N_R203K N_R203K N_G204R	N_28881-F	GCAACAGTTCAGAAATCAACTCC	28,845-29,913
			N_28881-R	CATTGCCAGCCATTCTAGCAG	
			N_28881-Pggg	FAM-AGCAGTAggGAACTT-MGB	
			N_28881-Paac	VIC-CAGCAGTAAcGAACTT-MGB	
S_varinat	a23063t	S_N501Y	S_N501Y-F	GGCCGGTAGCACACCTTGTA	22,984-23,124
			S_N502Y-R	GGTGCATGTAGAAGTTCAAAAGAAAG	
			S_N501a	FAM-AACCCACTaATGGTGTG-MGB	
			S_Y501t	VIC-AACCCACTtATGGTGTG-MGB	
S_varinat	21765-21767 21768-21770	S_del 69-70	S_69-F	CATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACC	21,704-21,813
			S_69-R	GGTAGGACAGGGTTATCAAACCTC	
			S_69-Probe	FAM-ATGCTATACatgTCTCTGGGAC-MGB	
			S_69-70del-Probe	VIC-TCCATGCTATCTCTGGGAC-MGB	
S_varinat	g23012a/c	S_E484K/Q	S_E484K-F	TATCAGGCCGGTAGCACACC	22,978-2,3061
			S_E484K-R	GTGGGTTGGAACCATATGATTG	
			S_E484g	FAM-ATGGTGTgAAGGTTT-MGB	
			S_K484a	VIC-AATGGTGTaAAGGTTTT-MGB	
			S_K484c	NED-AATGGTGTcAAGGTTTT-MGB	
S_varinat	a22812c g22813t	S_K417T S_K417N	S_K417NT-F	GAGGTGATGAAGTCAGACAAATCG	22,770-22,858
			S_K417NT-R	GCAGCCTGTAATAATCATCTGGTAA	
			S_K417ag	FAM-AACTGGAAagATTGCTGAT-MGB	
			S_N417at	VIC-AACTGGAAAtATTGCTGATT-MGB	
			S_T417cg	NED-ACTGGAAcGATTGCTGA-MGB	
S_varinat	c23525t	S_H655Y	S_H655Y-F	TTTCAAACACGTGCAGGCTG	22,489-23,564
			S_H655Y-R	CACCAATGGGTATGTCACACTCA	
			S_H655c	FAM-GGCTGAAcATGTCAA-MGB	
			S_Y655t	VIC-GGCTGAAtATGTCAAC-MGB	
S_varinat	c23604a/g	S_P681H/R	S_P681HR-F	TGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAG	23,563-23,643
			S_P681HR-R	GCAATGATGGATTGACTAGCTACACT	
			S_P681c	FAM-TAATTCTCtTCGGCGGG-MGB	
			S_H681a	VIC-CTAATTCTCaTCGGCGGG-MGB	
			S_R681g	NED-TAATTCTCgTCGGCGGG-MGB	
S_varinat	t22917g/a	S_L452R/Q	S_L452R-F	ACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGG	22,878-22,958
			S_L452R-R	TCTCAAAAGGTTGAGATTAGACTTCC	
			S_L452t	FAM-ATTATAATTACCtGTATAGATTGT-MGB	
			S_R452g	VIC-TTATAATTACCgGTATAGATTG-MGB	
			S_Q452a	NED-ATTATAATTACCAGTATAGATTGT-MGB	

感染研法発出
2021年2月感染研法発出
2021年5月

表2. スパイクタンパク領域に変異を持つ変異株

WHO分類	WHO label	Pango lineage	スパイクタンパク領域のアミノ酸変異						
			N501Y	del 69-70	E484K/Q	K417N/T	H655Y	P681H/R	L452R/Q
VOC	Alpha	B.1.1.7	Y	del	E	K	H	H	L
VOC	Beta	B.1.351	Y	—	K	N	H	P	L
VOC	Gamma	P.1	Y	—	K	T	Y	P	L
VOC	Delta	B.1.617.2	N	—	E	K	H	R	R
AFM	Epsilon	B.1.427,B.1.429	N	—	E	K	H	P	R
AFM	Zeta	P.2	N	—	K	K	H	P	L
VOI	Eta	B.1.525	N	—	K	K	H	P	L
AFM	Theta	P.3	Y	—	E	K	H	H	L
VOI	Iota	B.1.526	N	—	K	K	H	P	L
VOI	Kappa	B.1.617.1	N	—	Q	K	H	R	R
VOI	Lamda	C.37	N	—	E	K	H	P	Q
—	—	R.1	N	—	K	K	H	P	L
—	—	C.36.3	N	del	E	K	H	P	R
VOC	—	AY.1	N	—	E	N	H	R	R
VOC	—	AY.2	N	—	E	N	H	R	R
VOC	—	AY.3	N	—	E	K	H	R	R

VOC: Variant of Concern, VOI: Variant of Interest, AMF: Alerts for Further Monitoring

標的遺伝子の検出は以下の手順で行った。RNA 抽出液（または標準 DNA 液）3.0 μ L, 各プライマー100 μ M 0.25 μ L, 各プローブ 10 μ M 0.25 μ L および QuantiTect Probe RTPCR Kit (QIAGEN) を使用した（最終反応量 25 μ L）。QuantiStudio 12K Flex Realtime PCR System（サーモフィッシャー）を使用し、Genotyping モードで検査を行った。すなわち、25°C30秒 [測定], 50°C30分, 95°C10分反応させた後、95°C15秒, 60°C1分のサイクルを 45 回繰り返し、その後、25°C30秒 [測定] 反応させた。Genotyping モードは、リアルタイムPCR反応の前後に蛍光強度の測定を行い、アレル特異的プローブのレポーター色素が発する蛍光強度の差を比較し、標的遺伝子上の一塩基多型 (SNP) 部位に基づくジェノタイピングを行う測定法で、Allelic Discrimination Plot上にプロットされた位置により変異の有無を判定した。

結果および考察

1. 懸念される変異株等のスパイクタンパク質領域に変異を持つ変異株検出法の検討

感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株について、WHOはリスク分析を行い、「懸念される変異株 (Variant of Concern: VOC)」、「注目すべき変異株 (Variant of Interest: VOI)」、「さらなる監視のための警告 (Alerts for further Monitoring: AFM)」に分類し、定期的に更新している¹⁾ (表2)。VOC, VOI, AFMが持つ主要なスパイクタンパク質領域のアミノ酸変異は、ほぼ限定されていることから、それらの変異に特異的な塩基配列を検出する方法を検討した。

1) N501Yおよびdel 69-70検出法

リアルタイムPCR反応前後に蛍光強度の測定を行い、蛍

光強度差をFAM色素をY軸に、VIC色素をX軸にプロットすると、変異のない標準DNA (N501Nおよび69-70) はY軸側に、変異がある標準DNAはX軸側に位置し、蛍光強度の差をプロットしたチャート (Allelic Discrimination Plot) により対象変異の有無を判定することができた。

国立感染症研究所から供与されたB.1.1.7系統株 (アルファ株) のRNAを用いてN501Y検出法およびdel 69-70検出法を行ったところ、いずれの検体においても、N501Yおよびdel 69-70が検出され、スクリーニング検査に有用であることが示された (図1)。この情報を国立感染症研究所や東京iCDCと共有するとともに、東京都においては2020年12月28日より、構築したN501Yおよびdel 69-70検出法を用いて変異株スクリーニング検査を開始した。B.1.1.7系統株は、東京都内では2021年1月に初めて検出され、その後第4波の主流株となった¹⁵⁾。本株はWHOにおいて最初にVOCに位置付けられた系統¹⁾であり、N501Y変異が入ったことにより従来株よりも感染性が高まり¹⁶⁾、del 69-70は免疫逃避に

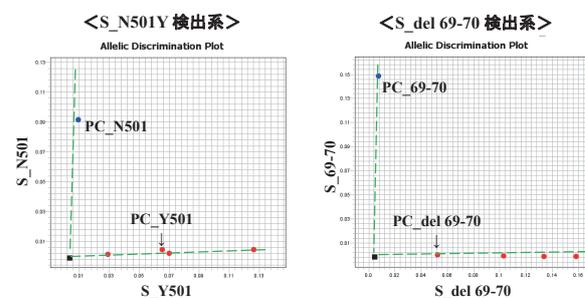


図1. リアルタイムPCR法を用いたSARS-CoV-2変異検出法の結果

(N501Y変異検出法およびdel 69-70検出法)

表3. リアルタイムPCR法による変異検出法を設定した位置および塩基配列

GISAI Clade	Nextstrain Clade	Pango Lineage	Accession ID	t8782c	c14408t	a23403g	g25563t	g26144t	c28144t	g28881a	g28882a	g28883c
				(orf1a)	orf1b_P314L	S_D614G	ORF3a_Q57H	ORF3a_G251V	ORF8_L84S	N_R203K	N_R203K	N_G204R
S	19B	A	EPI_ISL_403932	t	c	a	g	g	c	g	g	g
L	19A	B	EPI_ISL_402124	c	c	a	g	g	t	g	g	g
V	19A	B.2	EPI_ISL_412974	c	c	a	g	t	t	g	g	g
G	19A	B.1	EPI_ISL_406862	c	c	g	g	g	t	g	g	g
GH	20A	B.1*	EPI_ISL_418345	c	t	g	t	g	t	g	g	g
GR	20B	B.1.1	EPI_ISL_466615	c	t	g	g	g	t	a	a	c
GV	20E	B.1.177	EPI_ISL_539548	c	t	g	g	g	t	g	g	g

寄与していると報告¹⁷⁾されている。B.1.617.2系統株（デルタ株）が主流となっている第5波においても少ないながらも検出されていた。

2) E484K/Q, K417N/T, H655Y, P681H/R, L452R/Q変異検出法

E484K/Q, K417N/T, H655Y, P681H/R, L452R/Q変異は、表2に示すVOCやVOI等の特徴的な変異である。そこで、これらの変異について検出法を構築し、N501Y検出法およびdel 69-70検出法と同様に標準DNAを用いて検討したところ、いずれの変異についてもAllelic Discrimination Plotにより各変異の有無を判定することができた。

NGS解析により、2021年1月にE484K変異を持つR.1系統株が都内で複数検出されたことから、2021年2月15日よりE484K検出法を変異株スクリーニング検査に追加した。R.1株は東日本中心に検出され¹⁸⁾、東京都においても第4波前半の2021年3月から4月には、陽性例の過半数がR.1系統が占めた¹⁵⁾。E484K変異は、SARS-CoV-2を中和するモノクローナル抗体からの逃避を起こす変異として報告^{19,20)}され、R.1株についても同様の可能性が指摘されている。

VOCに位置付けられた¹⁾B.1.351系統株（ベータ株）およびP.1系統株（ガンマー株）は、共通してN501YとE484Kの変異を有することから、N501Y変異検出法とE484K変異検出法を用いた変異株スクリーニング検査で検出が可能であった。しかし、B.1.351系統株とP.1系統株との区別がつかないため、さらに迅速に型別する目的でK417N, K417T, H655YおよびP681H検出法を開発した。

2021年3月および4月に実施した変異株スクリーニング検査では、3例からN501YおよびE484Kが検出され、2例はB.1.351系統株（K417N, H655H, P681P）、1例はP.1系統株（K417T, H566Y, P681P）に型別できた。B.1.351系統株1例とP.1系統株1例は、NGS解析により全ゲノム配列からも確定できたが、B.1.351系統株1例はウイルス量が少なく、NGS解析による確定はできなかった。NGS解析にはCt値30未満のウイルス量が必要で、ウイルス量が少ない場合には解析が困難である²¹⁾。一方で、リアルタイムPCR法ではCt値40くらいまでの検出は可能であり、NGS解析よりも感度は高く、ウイルス量が少ない検体に対しても有効な手段となる。

2021年4月にL452R変異を持つ変異株（B.1.617.1系統株

：カッパ株、B.1.617.2系統株：デルタ株）が報告され、感染力が強く免疫逃避を起こす²²⁾ことから、WHOは5月にVOCに分類した¹⁾（B.1.617.1系統株は、6月にVOIに再分類された）。日本への流入が危惧されたため、2021年4月28日より開発したL452R検出法を加え、変異株スクリーニング検査項目（N501Y, E484K, L452R）の変更を行った。なお、L452R検査系は国立感染症研究所や東京iCDCにも情報提供し、その後、プライマーの変更を経て、2021年5月に地方衛生研究所の公定法として発出された。

東京都内では、B.1.617.2系統株は2021年4月に初めて検出され、2021年8月には主流株となった¹⁵⁾。B.1.617.1系統株は2021年4月に検出されたが、その後は検出されていない（2021年8月現在）。

2021年5月には北アフリカからの帰国者からイギリスでVUI（Variant under Investigation）に指定されていたC.36.3系統株²³⁾が検出された。C.36.3系統株は、L452Rに加えdel69-70があり、B.1.617.1系統株やB.1.617.2系統株が持つP681R変異を持たない（P681P）という特徴があり、構築した検出法を組み合わせ実施し、C.36.3であることを確認した。その後、NGS解析でもC.36.3であることを確認した。

オリンピック・パラリンピック2020大会開催に伴い、海外から日本にはない変異株が入ってくることが危惧された。世界的にB.1.1.7系統株とB.1.617.2系統株で占められていたが、南米でC.37系統株（ラムダ株）が一定の割合で検出されていたことから、C.37系統株が持つL452Q変異の検出法を構築し、C.37系統株の都内への流入に備えている。

2. B.1.1.7系統株出現以前の流行株についての解析

N501Y変異を持つB.1.1.7系統株が確認される前も、2019年12月にSARS-CoV-2が検出されて以降、従来株も少しずつ変異を起こしながら流行が続いていた。2020年12月以降に検出されたSARS-CoV-2の全ゲノム配列をもとに系統樹解析が行われ、7つのGISAD Cladeに分類されている²⁴⁾。代表株の配列を比較したところ、9ヶ所の変異をみることにより、分類が可能であった（表3）。9か所の変異の検出法を構築し、当センターで2020年1月から4月に検出されたSARS-CoV-2 236例を対象に変異の検出を行ったところ、S, L, GH, GVの4つのcladeに分類された（S：30例、L：85例、

GH : 17例, GR : 104例) .

Tangら²⁵⁾は, 初期にGISAIDに登録された103株の塩基配列を解析し, SタイプとLタイプに分類した. Sタイプ (clade S) は系統的にLタイプ (clade L) の武漢株 (Wuhan-Hu-1:GenBank_ID MN908947) よりも前に発生した型である. 日本では, 当初clade Sとclade Lがともに検出されていたが, clade Sは検出されなくなり, clade Lの株が拡大した. 2020年2月に発生したクルーズ船での集団発生例で検出された株も全てclade Lであった. その後も変異を重ね, S領域のD614G変異を持ち感染性が増強したclade Gおよびclade GH (ともにB.1系統株) が出現し, D614G変異を維持したclade GR (B.1.1系統株) が2020年2月から3月に欧州で流行し, 日本では, B.1.1系統株から派生したB.1.214系統株, B.1.284系統株が国内株として流行した.

ま と め

感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株に分類されている株に特徴的なスパイクタンパク質の変異 (N501Y変異, del 69-70変異, E484K変異, L452R変異等) を対象にSARS-CoV-2変異検出法を構築した. リアルタイムPCR法を用いることで, 短時間で大量の変異株検査を高感度を実施することができ, 早期に都内の感染状況を把握することが可能となった.

謝 辞 N501Y変異検出用リアルタイムPCR法の検証のため, B.1.1.7系統株 (アルファ株) のRNAを供与していただいた国立感染症研究所・脇田隆字先生, 黒田 誠先生に深謝いたします.

文 献

- 1) WHO: Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 2) CDC: SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 3) ECDC: SARS-CoV-2 variants of concern as of 20 August 2021, <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 4) 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) の新規変異株について (第12報), <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2484-idsc/10554-covid19-52.html> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) Callaway, E.: *Nature*, **585**, 174-177, 2020.
- 6) Nextstrain: Genomic epidemiology of novel coronavirus - Global subsampling, <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?l=clock> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 7) GISAID: <https://www.gisaid.org/> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 8) Nagashima, M., Kumagai, R., Yoshida, I., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.* **73**, 320-322, 2020.
- 9) 浅倉弘幸, 長島真美, 熊谷遼太, 他: 東京健安研七 年 報, **71**, 65-72, 2020.
- 10) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 他: 東京健安研七 年 報, **72**, 101-108, 2021.
- 11) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他: 東京健安研七 年 報, **72**, 73-79, 2021.
- 12) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年 報, **61**, 121-126, 2010.
- 13) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年 報, **62**, 57-63, 2011.
- 14) 熊谷遼太, 長島真美, 根岸あかね, 他: 東京健安研七 年 報, **70**, 33-38, 2019.
- 15) 東京都福祉保健局: 東京iCDCにおける変異株スクリーニング検査について, 都内の変異株の発生割合 (東京都健康安全研究センターによる調査), https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryoku/kansen/corona_portal/henikabu/screening.html (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 16) Leung, K., Shuum HH, M., Leung, M, G., *et al.*: *Euro Surveill*, **26**(1), 202106.2020.
- 17) Davis, GS., Abott, S., Barnard, C,R., *et al.*: *Science*, **372**: 6538, 2021
- 18) Nagano, K., Tani-Sassa, C., Iwasaki, Y., *et al.*: *medRxiv*, 2021. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.30.21259820v1.full.pdf> (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 19) Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., *et al.*: *Elife*, Oct 28; e61312, 2020. doi: 10.7554/eLife.61312.
- 20) Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J.C.C., *et al.*: *Nature*, Mar; **591**: 639-644, 2021.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課長: 健感発0205第4号, 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5月14日一部改正)
- 22) Motozono, C., Toyoda, M., Zahradnik, J., *et al.*: *Cell Host & Microbe*, **29**, 1124-1136. 2021.
- 23) Public Health England: SARS-CoV-2 variants of

- concern and variants under investigated in
England technical briefing 13, 22 May 2021
(updated 27 May 2021)
- 24) GISAID: Clade evolution in the first year,
<https://www.epicov.org/epi3/cfrontend#lightbox>
- 1130461485 (2021年8月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 25) Tang, X., Wu, C., Li, X., *et al.*: *National Science Review*, **7**, 1012-1023, 2020

Examination of Detection Method for Gene Mutation in SARS-CoV-2 Using Real-time RT-PCR Assay

Mami NAGASHIMA^a, Ryota KUMAGAI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Masaki HAYASHI^a,
Miyuki NAGANO^a, Takako YAMAZAKI^a, Yu YAOITA^a, Yurie KITAMURA^a, Michiya HASEGAWA^a,
Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Takashi CHIBA^a, Jun SUZUKI^a and Kenji SADAMASU^a

The coronavirus disease 2019 (COVID-19), which was first confirmed in China in December 2019, continues to be a pandemic in 2021. Most causes of the spread of infection are the epidemic of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants that have mutated to escape immunity, become more infectious, or increase transmission. Many of these variants have amino acid mutations of the spike protein genes. In this study, we constructed a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method to rapidly detect amino acid mutations that characterize the mutant strains, such as N501Y, del 69-70, E484KQ, and L452RQ mutation.

By using this method, it is possible to investigate a large number of viruses classified as variant of concern due to increased infectivity and/or transmission, and changes in antigenicity. Furthermore, it could be expected that the infection status in Tokyo can be grasped quickly.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, real-time RT-PCR, variant, Variant of Concern (VOC), Variant of Interest (VOI), S_N501Y, S_E484K/Q, S_L452R/Q

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan