

## 東京都健康安全研究センターにおける新型コロナウイルス変異株の検査対応

長島 真美<sup>a</sup>

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、2022年に入っても未だ収束していない。東京都健康安全研究センターではCOVID-19発生初期から検査対応を行ってきた。発生当初は新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を確実に検出することに主眼が置かれていたが、感染者の増加に伴い、さらに検査能力を上げることに注力することになった。その後、免疫からの逃避や感染性・伝播性が増加したSARS-CoV-2の変異株による感染が拡大し、変異株の流行状況や置き換わり状況の把握が主な業務となった。

SARS-CoV-2変異株の検出には、Allelic Discrimination modeによるリアルタイムPCR法により変異株に特徴的なアミノ酸変異を検出する手法を開発し、B.1.1.7系統株（アルファ株）のN501Y変異やB.1.617.2系統株（デルタ株）のL452R変異、オミクロン株のE484A変異などを検出し、変異株の疫学的なモニタリングを実施してきた。リアルタイムPCR法を用い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で、迅速かつ大量処理が可能であり、東京都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い。

**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）、新型コロナウイルス検査、変異株スクリーニング検査、変異株

### 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、わずか数カ月ほどの間にパンデミックと言われる世界的な流行となり、未だ収束がみえていない。さらに、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<sup>1-4)</sup>、今なお世界中がその動向に注視し続けている。

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ウイルスであるため、インフルエンザウイルスやHIVに比べ安定的<sup>5)</sup>であるが、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<sup>6)</sup>。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）に結合し、同じく細胞表面にあるII型膜貫通セリンプロテアーゼ（Transmembrane protease serine 2: TMPRSS2）が作用して細胞内に侵入する（オミクロン株は別の侵入経路を多く利用している）。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。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)<sup>7)</sup>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。

東京都健康安全研究センター（以下、都健安研）をはじめ<sup>8)</sup>、全国の地方衛生研究所（地衛研）は、COVID-19発

生初期から検査対応を行ってきた<sup>9)</sup>。発生当初はSARS-CoV-2を確実に検出することに主眼が置かれていたが、感染者の増加に伴い、検査キャパシティのさらなる向上が求められた。多くのSARS-CoV-2検査試薬が承認販売され、臨時の登録衛生検査所が認められるようになると、SARS-CoV-2検査の主体は医療機関や検査センターに移って行った<sup>10)</sup>。

一方で、変異株の出現・流行により、地衛研の業務でも全ゲノム解析が重要視されるようになった。SARS-CoV-2の全ゲノム配列の解析は、次世代シーケンサー（NGS）により行われる。COVID-19患者の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<sup>11)</sup>、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る<sup>12-14)</sup>。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件当たりのコストも高い。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った。都健安研では、B.1.1.7系統株（アルファ株）発生当初から、リアルタイムPCR法を用いたSARS-CoV-2変異株検出系の構築を行い<sup>15-17)</sup>、変異株の流行状況や変異株の置き換わり状況を報告してきた<sup>18)</sup>。これらの結果は、封じ込め対策やモニタリングに使用された。

本稿では、COVID-19発生初期から第7波流行期までの都健安研におけるSARS-CoV-2検査対応について、都内のSARS-CoV-2流行状況に沿って概説する。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

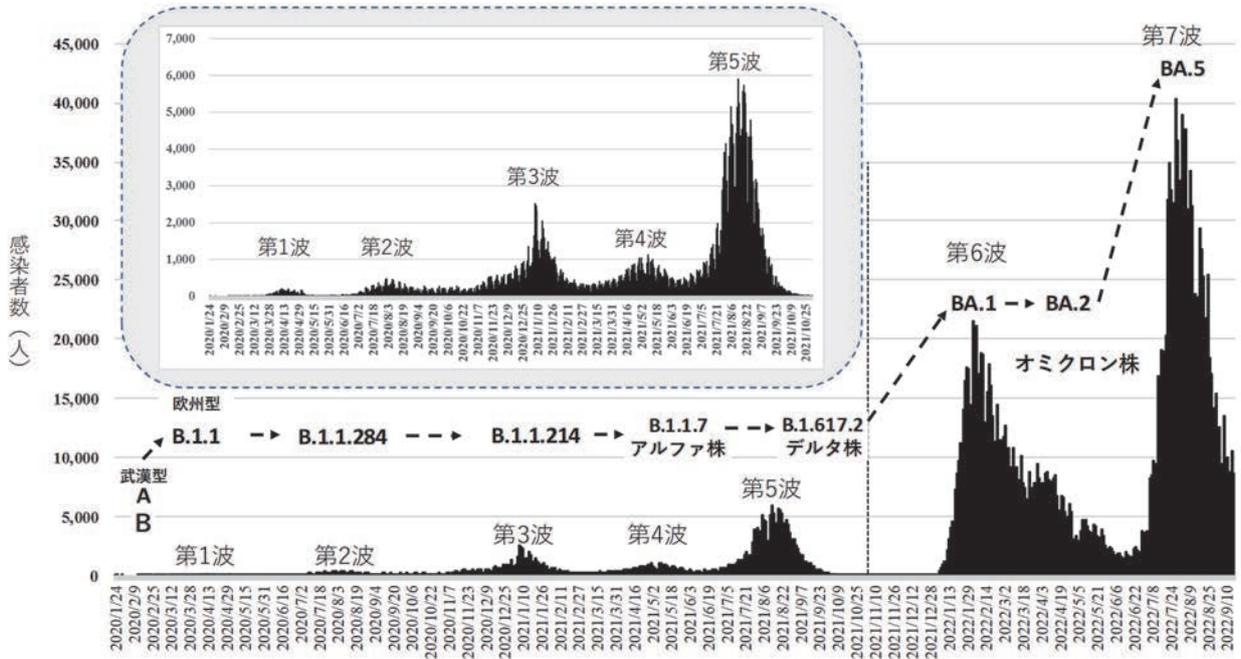


図1. 東京都における新型コロナウイルス感染者数とSARS-CoV-2主流株

### 都内の流行状況および検査対応

#### 1. 第1波前（2020年1月から2月）

2019年12月に中国湖北省武漢市で原因不明の肺炎が発生していることを受け、2020年1月6日厚生労働省から注意喚起がなされた<sup>8,19)</sup>。1月10日には国立感染症研究所（以下、感染研）の疑似症サーベイランスの運用ガイダンス<sup>20)</sup>が作成され、武漢市に滞在歴がある原因不明の肺炎患者に対するサーベイランス体制が敷かれた。

発生当初は病原体が特定されていなかったが、2020年1月13日にSARS-CoV-2の全塩基配列が世界的な遺伝子配列データベースであるGenBank<sup>21)</sup>上で公開され、1月17日にWHOが検査法を公開した。国内では1月18日に感染研からコンベンショナルPCR法による検査法がweb公開された<sup>8,22)</sup>。1月24日には地衛研に対し「2019-nCoV検査マニュアル」が示され、試薬と陽性コントロールが配布され、全国の地衛研でSARS-CoV-2検査体制が整備された。その後、マニュアルの改訂がなされ、リアルタイムPCR法による検査系に変更された<sup>8,23)</sup>。なお、当初、新型コロナウイルスは「2019-nCoV」と表されていたが、その後、「SARS-CoV-2」に変更された。

これまで、都健安研では新興感染症の発生時にはin houseの方法で検出系を構築してきており、COVID-19においても、2020年1月16日にGenBankの遺伝子情報を参考にコンベンショナルPCR法およびリアルタイムPCR法<sup>24)</sup>による検査系を独自に設計していた。その時点ではSARS-CoV-2陽性例をまだ経験していなかったため、都健安研リアルタイムPCR法で検出、感染研コンベンショナルPCR法を用いて塩基配列の確定を行うという2段階の方式によるSARS-CoV-2検査法であった。1月24日にはCOVID-19疑似例の検体が都健安研に搬入され、SARS-CoV-2遺伝子が

検出され、国内3例目かつ都内2例目の確定例となった<sup>8)</sup>。

この時期のSARS-CoV-2はプロトタイプであるA系統株もしくはB系統株であり、動物が持っていた2系統のウイルスが変異を経てヒトに感染した可能性が高いとされている<sup>25)</sup>。A系統株はB系統株の武漢株（Wuhan-Hu-1: GenBank\_ID MN908947）よりも前に発生した株で、日本でも当初A系統株とB系統株がともに検出されていたが<sup>11)</sup>、A系統株は直ぐに検出されなくなり、B系統株が進化を遂げ拡大していった。

#### 2. 第1波（2020年2月から5月）

中国武漢市からの帰国者を中心とした封じ込め対策が行われたのちには、欧州からの帰国者を中心に感染が確認された。また、飲食店等の屋内施設や医療機関、福祉施設等でもクラスターが発生し感染者数が増加した時期であった（東京都の最大新規陽性者報告数：206人/日）。疑似例や陽性者の陰性確認検査に加え、陽性者の接触者調査を中心に検査を実施するクラスター対策が取られ、保健所からの検査検体搬入数が増加した。この時期は、鼻咽喉ぬぐい液や喀痰を対象に、発生初期と同様に核酸を抽出したのちリアルタイムPCR法によるSARS-CoV-2遺伝子検出を行っていた。核酸抽出試薬やリアルタイムPCR法の試薬は海外製品を使用していたが、COVID-19の世界的流行の影響を受け入手困難となっていった。都健安研では新型インフルエンザ対策として検査試薬等の備蓄（10,000件分）を行っていたものの、試薬や専用消耗品の供給状況が好転しなかったため、国産の核酸抽出が不要なリアルタイムPCR検査試薬へ切り替えた。

この時期のSARS-CoV-2は、スパイクタンパク質にD614Gのアミノ酸変異を有する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も主流株となった。

### 3. 第2波 (2020年6月から10月)

接待を伴う飲食店などの繁華街、いわゆる「夜の街」を中心とした急速な感染拡大がみられ、若者への感染も報告された。東京都の最大新規陽性者報告数は472人/日で、新規感染者増加に加え、医療機関や福祉施設等でのクラスター発生数も増加し、感染疑い例や濃厚接触者を対象とした検査ニーズが日を迫るごとに高まっていった時期である。都健安研でも検査能力を上げるべく全自動遺伝子検査機器を導入し、1日あたり1,000件のSARS-CoV-2検査に対応が可能となった。

この時期の国内主流株は、B.1.1系統株から日本特有の進化を遂げたB.1.1.284系統株であった(図1)。

### 4. 第3波 (2020年11月から2021年2月)

新規陽性者、重症者ともに、第1波、第2波と比べ大幅に増加し、重症化リスクの高い高齢者が増加した(東京都の最大新規陽性者報告数: 2,520人/日)。家庭内感染の割合が増加し、年末年始の帰省やイベントによる会食機会が増加したことも感染拡大の一因とみられている。保健所が都健安研へ搬入する検体数も多く、月平均で10,000件を超えていた。

この時期の国内主流株は、B.1.1.284系統株と同じく日本特有の進化を遂げたB.1.1.214系統株であった(図1)。

2020年3月末頃から感染研の病原体ゲノム解析センターにおいて、地衛研で検査されたRNAについてもSARS-CoV-2のゲノム解析が行われてきた。第3波に入ったところから地衛研でゲノム解析が行われるようになり、感染経路の推定などの疫学解析にもゲノム解析結果が用いられるようになった<sup>14)</sup>。

### 5. 感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株の出現

2020年12月中旬以降、英国ではスパイクタンパク質のN501Y変異とdel 69-70(69,70番目のアミノ酸欠損)を持ち、従来の株より感染力が強いとされたB.1.1.7系統株(アルファ株)が報告された。また、感染力の強さに加え免疫逃避能を有するN501Y変異とE484K変異を持つ株として、南アフリカでB.1.351系統株(ベータ株)が、ブラジルからの帰国者でP.1系統株(ガンマ株)が報告された。このころから、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株の動向が世界的に注目されるようになり、WHOは変異株のリスク分析を行い、「懸念すべき変異株(Variant of Concern: VOC)」等に分類している<sup>15)</sup>。新たな変異株は大きな流行を引き起こす可能性があるため、第4波以降、世界各地で報告されるたびにその動向が注目されてきた。遺伝子変異はウイルス遺伝子全体で起こっているため、変異株の特徴を知るには、全ゲノム配列を取得し解析することが重要であるが、全ゲノム配列解析は時間もコストもか

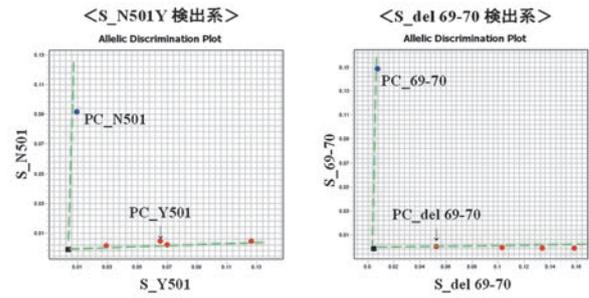


図2. リアルタイムPCR法を用いたSARS-CoV-2変異検出法の結果

(N501Y変異検出法およびdel 69-70検出法)

かる。一方で、変異株の感染性や免疫逃避能の増加は、表面タンパク質の一つであるスパイクタンパク質の変化が大きく寄与している。VOC等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、L452, E484およびN501等にはほぼ限定されている。そこで、著者らは、変異株に特徴的なスパイクタンパク質のアミノ酸変異を塩基配列ベースでリアルタイムPCR法により検出し、迅速に流行状況を把握する手法を開発した<sup>17)</sup>(図2)。この方法は、検出したい変異を検出するプローブ(VIC色素)とプロトタイプを検出するプローブ(FAM色素)を設計し、それぞれのプローブを混ぜてリアルタイムPCR反応を行う。Allelic Discrimination modeを用いて反応を行うと、リアルタイムPCR反応前後の強度差を二次元プロットしたチャートが作成される。変異がある場合はX軸側に、変異がない場合にはY軸側にプロットされ、対象変異の有無を視覚的に判定することができる。特に動向が注目される変異株が出現すると、必要なプライマー・プローブセットを逐次設計し、変異株スクリーニング検査の項目に加えた(表1-3)。この手法を用いる利点は、高感度であり、迅速に大量検体が処理できることである。40サイクル程度まで検出が可能であり、計算上、NGSよりも1,000倍感度が高く、96ウェルのマイクロプレートを利用し、数時間で結果が得られる。一方で、1領域の2つの変異を区別するだけであるため、複数の領域の変異を見るためには、複数回の変異株スクリーニング検査を実施する必要があった。

都健安研では、SARS-CoV-2検査陽性例について変異株スクリーニング検査を行い、都内における変異株の流行状況を継続的に明らかにしている<sup>18)</sup>(図3)。

### 6. 第4波 (2021年3月から6月)

第3波以前に流行していたいわゆる従来株よりも感染力が強いとされたB.1.1.7系統株(アルファ株)の流行により、若い世代を中心に感染が拡大した(東京都の最大新規陽性者報告数: 1,121人/日)。医療機関や高齢者施設、保育園、大学の寮などでクラスターが発生した。

英国やヨーロッパで発生が報告されていたB.1.1.7系統株(アルファ株)の特徴的な変異であるN501Y変異と

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')                      | 備考                                |
|---------------|--------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S_variant     | S_N501Y      | S_N501Y-F         | GGCCGGTAGCACACCTTGTGA             | 2020年12月<br>感染研法発出<br>(2021年2月改訂) |
|               |              | S_N502Y-R         | GGTGCATGTAGAAGTTCAAAAAGAAAG       |                                   |
|               |              | S_N501a           | FAM-AACCCACTaATGGTGTG-MGB         |                                   |
|               |              | S_Y501t           | VIC-AACCCACTtATGGTGTG-MGB         |                                   |
| S_variant     | S_del 69-70  | S_69-F            | CATTCAACTCAGGACTTGTTCCTTACC       |                                   |
|               |              | S_69-R            | GGTAGGACAGGGTTATCAAACCTC          |                                   |
|               |              | S_69-Probe        | FAM-ATGCTATACatgTCTCTGGGAC-MGB    |                                   |
|               |              | S_69-70del-Probe  | VIC-TCCATGCTATCTCTGGGAC-MGB       |                                   |
| S_variant     | S_E484K/Q    | S_E484K-F         | TATCAGGCCGGTAGCACACC              |                                   |
|               |              | S_E484K-R         | GTGGGTTGGAAACCATATGATTG           |                                   |
|               |              | S_E484g           | FAM-ATGGTGTgAAGGTTT-MGB           |                                   |
|               |              | S_K484a           | VIC-AATGGTGTtAaAGGTTTT-MGB        |                                   |
|               |              | S_Q484c           | NED-AATGGTGTtAAGGTTTT-MGB         |                                   |
|               | S_E484A      | S_omi_E484A-F     | TCTATCAGGCCGGTARCAMACC            |                                   |
|               |              | S_omi_E484A-R     | AGTGGGTYGGAAACYATATGATYG          |                                   |
|               |              | S_omi_E484g       | FAM-ATGGTGTGgAAGGTTT-MGB          |                                   |
|               |              | S_omi_A484c       | VIC-GGTGTGcAGGTTT-MGB             |                                   |
|               |              |                   |                                   |                                   |
| S_variant     | S_K417T      | S_K417NT-F        | GAGGTGATGAAGTCAGACAAATCG          |                                   |
|               |              | S_K417NT-R        | GCAGCCTGTAAAATCATCTGGTAA          |                                   |
|               |              | S_K417ag          | FAM-AACTGGAAgATTGCTGAT-MGB        |                                   |
|               |              | S_N417at          | VIC-AACTGGAAAtATTGCTGATT-MGB      |                                   |
|               |              | S_T417cg          | NED-ACTGGAAcGATTGCTGA-MGB         |                                   |
| S_variant     | S_H655Y      | S_H655Y-F         | TTTCAAACACGTCAGGCTG               |                                   |
|               |              | S_H656Y-R         | CACCAATGGGTATGTCACACTCA           |                                   |
|               |              | S_H655c           | FAM-GGCTGAAcATGTCAA-MGB           |                                   |
|               |              | S_Y655t           | VIC-GGCTGAAtATGTCAAC-MGB          |                                   |
|               |              |                   |                                   |                                   |
| S_variant     | S_P681H/R    | S_P681HR-F        | TGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAG         |                                   |
|               |              | S_P681HR-R        | GCAATGATGGATTGACTAGCTACACT        |                                   |
|               |              | S_P681c           | FAM-TAATTCTCtTCGGCGGG-MGB         |                                   |
|               |              | S_H681a           | VIC-CTAATTCTCaTCGGCGGG-MGB        |                                   |
|               |              | S_R681g           | NED-TAATTCTCgTCGGCGGG-MGB         |                                   |
| S_variant     | S_L452R/Q    | S_L452R-Fv4       | GCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATC      | <S_L452R><br>感染研法として発出<br>2021年5月 |
|               |              | S_L452R-Rv3       | ATCTCTCTCAAAAAGTTGAGATTAGAC       |                                   |
|               |              | S_L452t           | FAM-ATTATAATTACCtGTATAGATTGT-MGB  |                                   |
|               |              | S_R452g           | VIC-TTATAATTACCgGTATAGATTG-MGB    |                                   |
|               |              | S_Q452a           | NED-ATTATAATTACCcGTATAGATTGT-MGB  |                                   |
|               |              | S_M452at          | VIC-AATTATAATTACatGTATAGATTGT-MGB |                                   |
| S_variant     | S_ins 214EPE | Omi_ins214s-F1    | TTCTAAGCACACGCCTATTATAGTGC        |                                   |
|               |              | Omi_ins214s-R1    | TAAAGCCGAAAAACCCTGAGG             |                                   |
|               |              | Omi_ins214s       | FAM-TGAGCCAGAAGATC-MGB            |                                   |
| S_variant     | S_D339H      | S_G339D_2F        | CAAACCTCTAACTTTAGAGTCCAACCAAC     | Takemae N., et al.<br>(ref.41)    |
|               |              | S_G339D_2R        | CTGTTCCAAGCATAAACAGATGC           |                                   |
|               |              | S_339D_FAM-MGB_v2 | FAM-CCCTTTTgATGAAGTTT-MGB         |                                   |
|               |              | S_339H            | VIC-CCCTTTTcATGAAGTTT-MGB         |                                   |
| orf1a_variant | orf1a_S151R  | ORF1a_S135R-F     | CCGCAAGGTTCTTCTCGTAAG             |                                   |
|               |              | ORF1a_S135R-R     | GCTCGTCGCCTAAGTCAAATG             |                                   |
|               |              | ORF1a_S135t       | FAM-GGCCATAGtTACGGCG-MGB          |                                   |
|               |              | ORF1a_R135g       | VIC-GCCATAGgTACGGCG-MGB           |                                   |
| orf1a_variant | orf1a_T842I  | ORF1a_T842I-F     | GGTGATGACACTGTGATAGAAGTGC         |                                   |
|               |              | ORF1a_T842I-R     | CGAGTTCAACTGTATAGGCAGAGC          |                                   |
|               |              | ORF1a_T842c       | FAM-GTGAATATCAcTTTTGAACT-MGB      |                                   |
|               |              | ORF1a_I842t       | VIC-GTGAATATCAtTTTTGAACTT-MGB     |                                   |
| M_variant     | M_D3N        | M_D3N-F           | AGTTCCTGATCTTCTGGTCTAAACG         |                                   |
|               |              | M_D3N-R           | AGGAGCTTTTTAAGCTCTTCAACG          |                                   |
|               |              | M_D3g             | FAM-ATGGCAgATTCC-MGB              |                                   |
|               |              | M_N3a             | VIC-TGGCAaATTCC-MGB               |                                   |
| N_variant     | N_P151S      | N_P151S-F         | GAATACACCAAAAAGATCACATTGGC        |                                   |
|               |              | N_P151S-R         | GAAGTTGTAGCACGATTGCAGC            |                                   |
|               |              | N_P151c           | FAM-CCGCAATcCTGCTAA-MGB           |                                   |
|               |              | N_S151t           | VIC-CCCgCAATtCTGCTAA-MGB          |                                   |
|               |              |                   |                                   |                                   |

表2. 変異株スクリーニング検査対象のアミノ酸変異

| WHO label | Pango lineage   | Sタンパク |           |         |         |       |         |         |
|-----------|-----------------|-------|-----------|---------|---------|-------|---------|---------|
|           |                 | N501Y | del 69-70 | E484K/Q | K417N/T | H655Y | P681H/R | L452R/Q |
| Alpha     | B.1.1.7         | Y     | del       | E       |         | H     | H       | L       |
| Beta      | B.1.351         | Y     | —         | K       | N       | H     | P       | L       |
| Gamma     | P.1             | Y     | —         | K       | T       | Y     | P       | L       |
| Delta     | B.1.617.2       | N     | —         | E       |         | H     | R       | R       |
|           | AY.1            | N     | —         | E       | N       |       | R       | R       |
|           | AY.2            | N     | —         | E       | N       |       | R       | R       |
|           | AY.3            | N     | —         | E       | K       |       | R       | R       |
| Epsilon   | B.1.427,B.1.429 | N     | —         | E       |         |       |         | R       |
| Zeta      | P.2             | N     | —         | K       |         |       |         | L       |
| Eta       | B.1.525         | N     | —         | K       |         |       |         | L       |
| Theta     | P.3             | Y     | —         | E       |         |       | H       | L       |
| Iota      | B.1.526         | N     | —         | K       |         |       |         | L       |
| Kappa     | B.1.617.1       | N     | —         | Q       |         |       | R       | Q       |
| Lamda     | C.37            | N     | —         | E       |         |       | P       | Q       |
| Mu        | B.1.621         | Y     | —         | K       |         |       | H       | L       |
|           | R.1             | N     | —         | K       |         |       | P       | L       |
|           | C.36.3          | N     | del       | E       |         |       | P       | R       |

表3. 変異株スクリーニング検査対象のアミノ酸変異 (オミクロン株)

| WHO label | Pango lineage | Sタンパク |           |           |         |           |       | Nタンパク | Mタンパク |
|-----------|---------------|-------|-----------|-----------|---------|-----------|-------|-------|-------|
|           |               | N501Y | del 69-70 | ins214EPE | G339D/H | L452R/Q/M | E484A | D3N   | P151S |
| Omicron   | BA.1          | Y     | del       | ins       | D       | L         | A     | D     | P     |
|           | BA.2          | Y     | —         | —         | D       | L         | A     | D     | P     |
|           | BA.2.12.1     | Y     | —         | —         | D       | Q         | A     | D     | P     |
|           | BA.2.56       | Y     | —         | —         | D       | M         | A     | D     | P     |
|           | BA.2.75       | Y     | —         | —         | H       | L         | A     | D     | P     |
|           | BA.4          | Y     | del       | —         | D       | R         | A     | D     | S     |
|           | BA.5          | Y     | del       | —         | D       | R         | A     | N     | P     |

del 69-70の検出法を構築し<sup>17)</sup>, 2020年12月28日より, 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, 4月に入り検出数が増加し, その後第4波の主流株となった<sup>20)</sup> (図3).

都内において, 2021年1月に全ゲノム解析によりE484K変異を持つR.1系統株が都内で複数検出されていたことから, 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, モニタリングを開始した. R.1系統株は東日本を中心に検出され<sup>26)</sup>, 都内においても第4波前半の2021年3月から4月には, 陽性例の過半数をR.1系統が占めた<sup>18)</sup>. 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<sup>27,28)</sup>され, R.1系統株についても同様の可能性が指摘されていた. R.1系統株は都内では5月23日まで検出されていたが (図3), B.1.1.7 (アルファ株) の置き換わりにより消失した.

当時VOCに位置付けられ<sup>1)</sup> B.1.1.7系統株 (アルファ株) とともに動向が注目されていた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において, 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) に型別された. B.1.351系統株1例とP.1系統株1例は, NGSにより得られた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<sup>17)</sup>.

NGSによる全ゲノム配列取得には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<sup>29)</sup>. 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, ゲノム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であった.

2021年5月には北アフリカからの帰国者からイギリスで

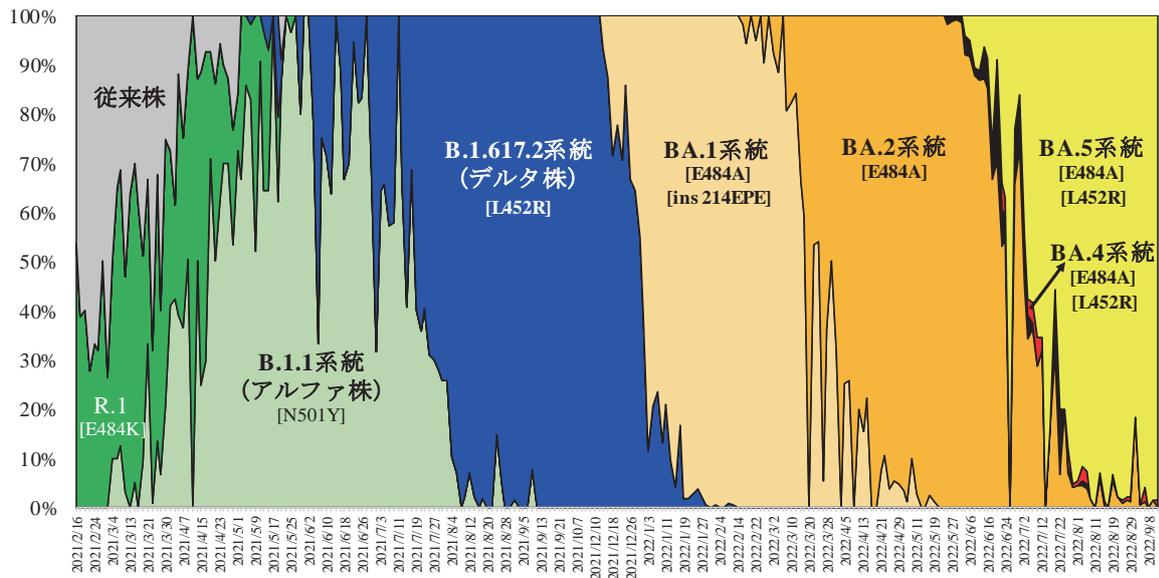


図3. 東京都におけるSARS-CoV-2変異株の推移とスパイク蛋白の特徴的なアミノ酸変異

VUI (Variant under Investigation) に指定されていたC.36.3系統株<sup>30)</sup>が検出された。C.36.3系統株は、B.1.617.2系統株(デルタ株)等が持つL452Rに加えdel 69-70があり、B.1.617.1系統株(カッパ株)やB.1.617.2系統株(デルタ株)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ることで、C.36.3系統株であることを確認した。その後、NGS解析を実施しC.36.3系統株であることを確定した。

2022年8月31日現在、B.1.1.7系統株(アルファ株)、B.1.351系統株(ベータ株)およびP.1系統株(ガンマ株)は検出されておらず、いずれも「かつて懸念される変異株として流行していた株(Previously circulating VOCs)」として位置づけられている<sup>1)</sup>。

### 7. 第5波(2021年7月から10月)

感染力が強く重症化リスクの高い変異株B.1.617.2系統株(デルタ株)への置き換わりが急速に進行した(東京都の最大新規陽性者報告数: 5,908人/日)。高齢者のワクチン接種が進んだことで、陽性者・入院患者は高齢者から中高年層や若年層へと拡大した。

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<sup>31)</sup>ことから、WHOは5月にVOCに分類した<sup>1)</sup>。日本への流入が危惧されたため、2021年4月28日より都健安研で開発したL452R検出法を変異株スクリーニング検査に加えた。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(デルタ株)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<sup>18)</sup>(図3)。B.1.617.1系統株(カッパ株)は2021年4月に一時的に検出されたが、その後は検出されていない。

また、この時期は、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ていた。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(表1, 2)、C.37系統株の都内への流入に備えた。結果的に都内でC.37系統株の探知はなく、オリンピック・パラリンピック2020大会期間中にB.1.1.7系統からB.1.617.2系統株に置き変わった<sup>32)</sup>。

2022年8月31日現在、B.1.617.2系統株(デルタ株)は「かつて懸念される変異株として流行していた株(Previously circulating VOCs)」として位置づけられている<sup>1)</sup>。

### 8. 第6波(2022年1月から6月)

これまでで最も感染力の強い変異株(オミクロン株)により、新規陽性者が急激に増加した(東京都の最大新規陽性者報告数: 21,562人/日)。家庭内感染の増加により、子供や重症化リスクの高い高齢者への感染が拡大した。

B.1.1.529(オミクロン株)はスパイクタンパク質に30ヶ所以上のアミノ酸変異を有しており、特徴的な変異は、E484A変異とN501Y変異であった。WHOは2021年11月24日に「監視下の変異株(Variant Under Monitoring; VUM)」に分類したが、11月26日にウイルス特性の変化の可能性を考慮し、「懸念される変異株(Variant of Concern; VOC)」に位置づけを変更した<sup>1)</sup>。これまでの株よりも伝染性は高

いが、病原性が低く、重症度も低いとされ<sup>33-35)</sup>, B.1.1.529 (オミクロン株)は派生系統としてBA.1系統やBA.2系統等が位置付けられている。

都健安研では、2021年12月3日にE484A検出法を変異株スクリーニング検査に加えた(表1, 3)。12月中旬に初めて検出されたのち、2022年1月には主流株となったが、さらにBA.2系統株の流行が危惧されたことから、BA.1系統株だけにみられる挿入配列であるins 214EPEの検出法を構築し(表1, 3)、1月31日より検査を開始した。BA.2系統株は2月上旬に初めて検出され、4月上旬には主流株となった<sup>18)</sup>(図3)。また、BA.2系統の亜系統であるBA.2.12.1系統株が2022年3月中旬に米国東海岸で検出され、5月下旬以降には米国全体で検出された株の約60%を占めたため、日本国内での流行が危惧された。BA.2.12.1系統株はC.37系統株(ラムダ株)と同じL452Q変異を有しているため、直ぐに検査対応が可能で検査を開始したが、BA.5系統株への置き換わりを受け、都内では散発的に検出されたものの大きな流行にはならなかった。

2022年3月の終わりにはBA.1とBA.2の組み替え体が報告<sup>36)</sup>され、組み替え体のひとつであるXE株は英国内で集団感染が発生し、感染者の増加する速度がBA.2より12.6%高いとされた<sup>37)</sup>。XE株をはじめとして流行の恐れがある組み替え体は、orf1a領域がBA.1、スパイクタンパク質領域がBA.2であったことから、orf1a領域の検出法を追加した組み替え体の検査系を構築し(表1)、流行に備えた。民間検査センターで実施しているゲノム解析ではXJ様の株が検出された<sup>38)</sup>が、都健安研で実施している変異株スクリーニング検査では検出されなかった。

## 9. 第7波(2022年7月以降)

第6波を上回る勢いで感染者数が報告されていたが、7月下旬をピークに減少に転じている(東京都の最大新規陽性者報告数: 40,406人/日)(2022年9月現在)。

2022年1月にBA.4系統株が、2月にBA.5系統株がいずれも南アフリカ共和国で検出され、拡大が懸念された。BA.4系統株、BA.5系統株が有する遺伝子変異はBA.2系統とかなり共通しており、L452R変異を有することから免疫逃避の可能性が示唆されている<sup>39)</sup>。BA.4系統株とBA.5系統株を区別するため、N領域P151S変異検出法およびM領域D3N変異検出法を構築し(表1, 3)、2022年5月24日より変異株スクリーニング検査を加えた。BA.5系統は5月下旬に初めて検出され7月下旬には検出株の8割以上を占め、BA.2からの置き換わりがみられた。BA.4系統株は6月中旬に初めて検出されたものの、全体の5%に満たない。

2022年6月にBA.2.75系統株がインドから報告され、感染者増加の優位性や免疫逃避が懸念された。Caoら<sup>40)</sup>によるヒト血清を用いた抗原性の評価によると、BA.2.75系統株の中和抗体からの逃避は、BA.2.12.1系統株より強く、BA.4系統株やBA.5系統株よりも弱いとされている。BA.2.75系統の特徴としてはD339H変異があり、既存の

G339H検出系<sup>41)</sup>を改変してD339H変異検出系を構築した(表1, 3)。2022年7月20日より変異株スクリーニング検査にD339H変異検出系を加えたが、変異株スクリーニング検査では1例のみ検出されただけである(2022年8月現在)。BA.5系統株への置き換わった国でBA.2.75系統株への置き換わりが進んでいる国はみられていないが、民間検査センターで実施しているゲノム解析で多くはないが検出されており、まだ動向を注視する必要がある。

2022年8月31日現在、BA.1系統株、BA.2系統株、BA.3系統株、BA.4系統株およびBA.5系統株およびそれぞれの下位系統株は、XE等の組み替え体を含め、「オミクロン株」と総称され、流行している懸念される変異株(Currently circulating variants of concern: VOCs)として位置づけられている<sup>1)</sup>。東京都内ではBA.5系統株にほぼ置き換わっており、BA.5系統株の中での様々な派生株も出現している。海外においても様々な変異が進み、亜系統の分類が薦められており、監視下のオミクロン株の亜系統(Omicron subvariants under monitoring)として、監視が強化されている<sup>1)</sup>。都健安研としては、NGS解析のみならず、リアルタイムPCR法による変異株スクリーニング検査を今後も継続していく予定である。

## ま と め

病原体の検査およびモニタリングは、地衛研の主たる検査業務である。SARS-CoV-2はHIVと比較すると変異頻度は少ないが、短期間に多くの変異株(VOC)が報告された。これらの変異株の解析はNGSを用いた全ゲノム解析が推奨されているが、NGS解析は時間がかかり、コスト高でもある。一方で、リアルタイムPCR法を用いた変異株スクリーニング検査は、迅速かつ大量処理が可能であり、計算上NGSよりも1,000倍感度が高い。

都健安研では様々なSARS-CoV-2変異株を検出する変異株スクリーニング検査法を新たに開発し、東京都内での当初の封じ込め策やその後のモニタリング手法として活用している。

## 文 献

- 1) WHO: Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2022年9月30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-classifications.html> (2022年9月30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 22 September 2022, <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (2022年9月30日現在。なお本URLは変更または抹消

- の可能性がある)
- 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20報), <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11469-sars-cov-2-20.html> (2022年9月30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/6m?l=clock> (2022年9月30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/> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 8) 千葉隆司, 貞升健志, 長島真美, 他：東京健安研七周年報, **71**, 39–46, 2020
  - 9) 貞升健志：ぶんせき, **554**, 46–51, 2021
  - 10) 貞升健志, 吉村和久：公衆衛生, **86**, 691–698, 2022
  - 11) Nagashima, M., Kumagai, R., Yoshida, I., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.* **73**, 320–322, 2020.
  - 12) 浅倉弘幸, 長島真美, 熊谷遼太, 他：東京健安研七周年報, **71**, 65–72, 2020.
  - 13) 浅倉弘幸, 吉田 勲, 熊谷遼太, 他：東京健安研七周年報, **72**, 101–108, 2021.
  - 14) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他：東京健安研七周年報, **72**, 73–79, 2021.
  - 15) 長島真美：東京都微生物検査情報, **41**, 45–46, 2020
  - 16) 長島真美：東京都微生物検査情報, **42**, 46–47, 2021
  - 17) 長島真美, 熊谷遼太, 河上麻美代, 他：東京健安研七周年報, **71**, 65–71, 2021.
  - 18) 東京都福祉保健局：変異株について, 健安研における変異株PCR検査について, [https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/kansen/corona\\_portal/henikabu/screening.html](https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/kansen/corona_portal/henikabu/screening.html) (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 19) 厚生労働省健康局結核感染症課：中華人民共和国湖北省武漢市における原因不明肺炎の発生について, [https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_08767.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_08767.html) (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 20) 厚生労働省健康局結核感染症課：新型コロナウイルスに関連した肺炎患者の発生に係る注意喚起について (事務連絡), 令和2年1月17日.
  - 21) GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 22) Nao, N., Shirato, K., Matsuyama, S., *et al.*: Detection of WN-Human1 sequence from clinical specimen. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/coronavirus/2019-ncov/2484-idsc/9311-detection-of-wn-human1-sequence-from-clinical-specimen.html> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 23) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.3, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200206.pdf> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
  - 24) Nagashima, M., Kumagai, R., Yoshida, I., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **73**, 320–322, 2020.
  - 25) Pekar, J.E., Magee, A., Parker, E., *et al.*: *Science*. **377**, 960–966, 2022.
  - 26) Nagano, K., Tani-Sassa, C., Iwasaki, Y., *et al.*: *J Med Virol.*, **93**: 6833–6836, 2021.
  - 27) Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., *et al.*: *Elife*, Oct 28; e61312, 2020. doi: 10.7554/eLife.61312.
  - 28) Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J.C.C., *et al.*: *Nature*, Mar; **591**: 639–644, 2021.
  - 29) 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) .
  - 30) 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)
  - 31) Motozono, C., Toyoda, M., Zahradnik, J., *et al.*: *Cell Host & Microbe*, **29**, 1124–1136, 2021.
  - 32) 貞升健志, 長島真美, 横山敬子：病原微生物検出情報, **43**, 155–158, 2022.
  - 33) Wolter, N., Jassat, W., Walaza, S., *et al.*: *Lancet*, **399**, 437–446, 2022.
  - 34) Lewnard J.A., Hong V.X., Patel M.M., *et al.*: *Nature Medicine*, **28**, 1933–1943, 2022.
  - 35) Iuliano, A.D., Brunkard, J.M., Boehmer, T.K., *et al.*: *MMWR*, **71**, 146–152, 2022.
  - 36) UK Health Security Agency: SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigated in England Technical briefing 39, 25 March 2022.
  - 37) UK Health Security Agency. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England: Technical briefing 40. 8 April 2022.
  - 38) 根岸あかね, 林 真輝, 山崎 貴子, 他, : 東京健安研七周年報, **73**, 115–121, 2022.
  - 39) Cao, Y., Yisimayi, A., Jian, F., *et al.*: *Nature*, **608**, 593–602, 2022.
  - 40) Cao, Y., Yu, Y., Song, W., *et al.*: bioRxiv, 2022.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.07.18.500332v1.full.pdf> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

41) Takemae, N., Doan, Y.H., Momose, F., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **75**, 411–414, 2022.

**Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 Variants at Tokyo Metropolitan Institute of Public Health.**Mami NAGASHIMA<sup>a</sup>

The coronavirus disease 2019 (COVID-19), which was first confirmed in China in December 2019, has not yet been contained in 2022. Tokyo Metropolitan Institute of Public Health (TMIPH) has been in charge of testing since the early stages of the COVID-19 outbreak. At the beginning of the outbreak, the main focus of TMIPH was on reliably detecting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), but as the number of COVID-19 patients increased, the focus shifted to increasing SARS-CoV-2 testing capacity. Subsequently, our mission shifted to catching the epidemiological surveillance and replacement status of SARS-CoV-2 variants that escape immunity, become more infectious and increase transmission.

For efficient testing, we have developed SARS-CoV-2 variants screening tests by using the allelic discrimination real-time PCR method that detected N501Y of Spike protein mutation in B.1.1.7 (alpha variant), L452R mutation in B.1.617.2 (delta variant) and E484A mutation in Omicron variants. SARS-CoV-2 variants screening tests are highly sensitive, rapid, and mass-processable than next-generation sequencer analysis, and have played a significant role in the monitoring of SARS-CoV-2 variants in Tokyo.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, SARS-CoV-2 test, variant, SARS-CoV-2 variants screening test

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan