

新型コロナウイルス陽性検体における核酸多項目同時検出試薬を用いた網羅的な検索

北村 有里恵^a, 黒木 絢士郎^a, 熊谷 遼太^a, 原田 幸子^a, 浅倉 弘幸^a, 根岸 あかね^a,
河上 麻美代^a, 伊藤 仁^a, 糟谷 文^a, 天野 有紗^a, 横田 翔太^a, 矢尾板 優^a,
岡田 若葉^a, 小泉 美優^a, 林 志直^a, 磯貝 まや^a, 九澤 香織^a,
長谷川 道弥^a, 藤原 卓士^a, 三宅 啓文^b, 長島 真美^a, 貞升 健志^b
(外部機関査読者: 蕪木 康郎^c)

2023年5月, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が5類感染症に移行し, 感染症防止対策が個人・事業者の自主的な判断と取組が尊重されるようになった. 社会経済活動, 生活様式が活発となったことで, コロナ流行以前に近い日常を送れるようになり, 流行が抑制されていた呼吸器系感染症等に再度, 流行の兆しがみられるようになった. 今回, 2023年1月30日から2023年3月31日の期間に, 東京都健康安全研究センターに搬入された民間検査機関により新型コロナウイルス検査陽性となった患者検体 (咽頭拭い液または唾液) について, 新型コロナウイルスやインフルエンザウイルスの同時感染, またその他病原体による重複感染の探知を目的として, 核酸多項目同時検出試薬を用いて病原体の検索を行った.

その結果, 対象とした120検体中4検体 (3.3%) からインフルエンザウイルスが検出され, ヒトコロナウイルスとの重複検出は8検体 (6.6%) であり, 様々な呼吸器系病原体の網羅的な検出にFilmArray呼吸器パネル2.1の使用は適していると思われた. 感染症発生动向調査の観点では, COVID-19の中にインフルエンザウイルス感染者やその他のウイルス感染者が含まれている可能性は少ないことから, SARS-CoV-2の検体を集める場合にはCOVID-19患者検体を集め, インフルエンザウイルスの検体を集める場合には, インフルエンザ患者検体を集めるべきであることが結論づけられた.

キーワード: 新型コロナウイルス感染症, SARS-CoV-2, インフルエンザウイルス, 重複感染

はじめに

2019年12月に新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による世界的なパンデミックが発生して以来, 日本では, 冬季におけるSARS-CoV-2とインフルエンザウイルスの同時罹患は常に想定されており, 医療機関での対応が課題とされてきた. 厚生労働省が各関連機関と連携をして立ち上げた「新型コロナ・インフル同時流行対策タスクフォース」においても, 同時流行下に多数の患者等が生じる可能性を想定し, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の発熱外来の強化, インフルエンザ等により受診を希望する患者の診療体制の強化への対策を行っていた¹⁾.

2022年5月から始まった新型コロナワクチン4回目以降の接種の推進もあり, 感染拡大防止と社会経済活動の回復との両立を進める方針の下, 行動制限のない年末年始を迎え, 人流はCOVID-19流行後最も高い水準に到達した²⁾.

そうした背景もあり, 2022/2023シーズンは国内および都内において3年ぶりにインフルエンザの流行が見られた. 東京都では第36週 (9/5~9/11) からインフルエンザの発生が報告され, 2022年12月22日 (第51週) に流行開始, 2023年2月3日 (第5週) に東京都として流行注意報が発令された³⁾.

2023年5月8日にはCOVID-19は感染症法上の5類感染症

となった⁴⁾. それに伴い, 基本的な感染対策において, マスク着用の考え方も個人の判断を尊重することとなった. また, この間, 流行が抑制されていた感染症も多いが, RSウイルスのように2021年に大流行するなど⁵⁾, 状況は絶えず変化している.

呼吸器感染症は咳や発熱, 上気道炎, 下気道炎, 倦怠感など, 似た症状を持つため, 病原体が一樣ではなく⁶⁾, 幅広い網羅的な病原体検索が必要とされる. 今回, 2022年~2023年の冬季におけるSARS-CoV-2, インフルエンザウイルスの同時感染, また, その他病原体による重複感染の探知を目的として, 多種類の呼吸器疾患起因病原体の検出が可能核酸多項目同時検出試薬である, FilmArray呼吸器パネル2.1 (ピオメリュー, 以下, 呼吸器パネル) を用い, 呼吸器感染症における幅広い病原体検索を行ったのでその結果を報告する.

実験方法

1. 供試材料

2023年1月30日から2023年3月31日の期間に, 民間検査機関により新型コロナウイルス検査陽性と判定され, 東京都健康安全研究センターに搬入された患者検体 (咽頭拭い液

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

^c さいたま市健康科学研究センター

表1. FilmArray呼吸器パネル2.1検出対象微生物

ウイルス (17種類)	Adenovirus	Influenza A H1
	Coronavirus (hCoV) 229E	Influenza A H1-2009
	Coronavirus (hCoV) HKU1	Influenza A H3
	Coronavirus (hCoV) NL63	Influenza B
	Coronavirus (hCoV) OC43	Parainfluenza Virus 1
	SARS-CoV-2	Parainfluenza Virus 2
	Human Metapneumovirus	Parainfluenza Virus 3
	Human Rhinovirus/Enterovirus	Parainfluenza Virus 4
	Respiratory Syncytial Virus	
	細菌 (3種類)	<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
クラミジア	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	

または唾液) について、長島ら^{7, 8)} のプロトコルに従い変異株スクリーニング検査を実施し、判定不能を除く変異株が決定されたうちの120検体を対象とした。

2. 核酸多項目同時検出試薬を用いた検査方法

搬入された新型コロナウイルス検査陽性検体（咽頭拭い液または唾液）は、保存液により不活化済であったため、これら検体溶液300 μ Lを試料液として用い、FilmArray呼吸器パネル2.1による測定を行った。本試薬は一回の測定で21種類の病原体（ウイルス17種類、細菌3種類、クラミジア1種類）が同時に検出可能であり、検出対象微生物は表1に示した。なお、ライノウイルス属とエンテロウイルス属は区別できず、ライノウイルス/エンテロウイルスと表示される。これらについては、後述のエンテロウイルスを検出・型別する遺伝子検査を実施し、塩基配列の解析によりウイルス種を同定した。なお、FilmArray呼吸器パネル2.1による検査は添付文書⁹⁾ に、それ以外の検査は所内SOPに従い検査を実施した。

結果及び考察

1. 核酸多項目同時検出試薬検査結果

2023年1月30日から2023年3月31日（5～13週）の期間に、当センターに隔日ごとに搬入された検体で、呼吸器パネルによる測定を実施し、結果を週ごとに示した（図1）。週により当センターに搬入される検体数にばらつきがあったため、呼吸器パネルの実施数にもばらつきが生じた。

呼吸器パネルにおいて120検体を検査した結果、118検体（98.3%）からSARS-CoV-2が検出され、13検体（10.8%）からSARS-CoV-2以外の病原体が検出された。

病原体が複数検出された検体数の内訳は1/30～2/3の週では3検体、2/6～2/10の週では4検体、2/13～2/17、2/20～2/24、2/27～3/3、3/27～3/31の4週ではそれぞれ1検体であった。3/13～3/17の週については2検体のうち1検体はSARS-CoV-2との重複した検出であったが、1検体はSARS-CoV-2が検出されず、それ以外の複数の病原体のみが検出された。

表2. 呼吸器パネル検出ウイルスの重複検出数の内訳

重複検出数	FilmArray検出ウイルス	検出数
2	SARS-CoV-2 Influenza A H3	3
	SARS-CoV-2 Influenza B	1
	SARS-CoV-2 Coronavirus HKU1	4
	SARS-CoV-2 Coronavirus OC43	2
	SARS-CoV-2 Human Rhinovirus/Enterovirus	1
3	Coronavirus NL63 Human Rhinovirus/Enterovirus Influenza A [判定保留]	1
	SARS-CoV-2 Coronavirus OC43 Human Rhinovirus/Enterovirus Parainfluenza Virus 1	1

2. 核酸多項目同時検出試薬結果の検出病原体の内訳

呼吸器パネルによる測定を実施した120検体中、複数の病原体が検出された検体について、重複検出数別に内訳を示した（表2）。

2つまたは4つの病原体が重複検出された検体からはいずれもSARS-CoV-2が検出されたが、3つの病原体が検出された検体からは、SARS-CoV-2が検出されず、ヒトコロナウイルス（hCoV）NL63、ライノウイルス/エンテロウイルス、Influenza A [判定保留] が検出された。なお、インフルエンザA型 [判定保留] の結果となった検体について、当センターのリアルタイムPCR法¹⁰⁾ を実施したところ、陰性の結果であった。

ライノウイルス/エンテロウイルスが検出された3検体については、マニュアル¹¹⁾ に従い、コンベンショナルPCR法を行った後、シーケンス解析により、遺伝子型等を決定した。「重複検出数が2つ」および「重複検出数が3つ」の検体から検出されたライノウイルス/エンテロウイルスは遺伝子型別で、どちらもライノウイルスC型と決定した。「重複検出数が4つ」の検体から検出されたライノウイルス/エンテロウイルスについてはコンベンショナルPCR法で増幅が認められなかったため、病原体の確定には至らなかった。

また、「重複検出数が4つ」の検体から検出されたウイルス、hCoV OC43とパラインフルエンザウイルス1型に対して、それぞれコンベンショナルPCR法¹²⁾、リアルタイムPCR法¹³⁾ を行ったところ、hCoV OC43に対して行ったコンベンショナルPCR法で増幅は認められず、パラインフルエンザウイルス1型に対して行ったリアルタイムPCR法についても陰性の結果となった。添付文書では、一つの検体から4種類以上の微生物の存在が確認された場合は再試験の実施が推奨されている。「重複検出数が4つ」であった検体について、コンベンショナルPCR法およびリアルタイムPCR法では、呼吸器パネルで検出された病原体の検出を試みたところ、いずれの病原体も検出できず、ウイルス

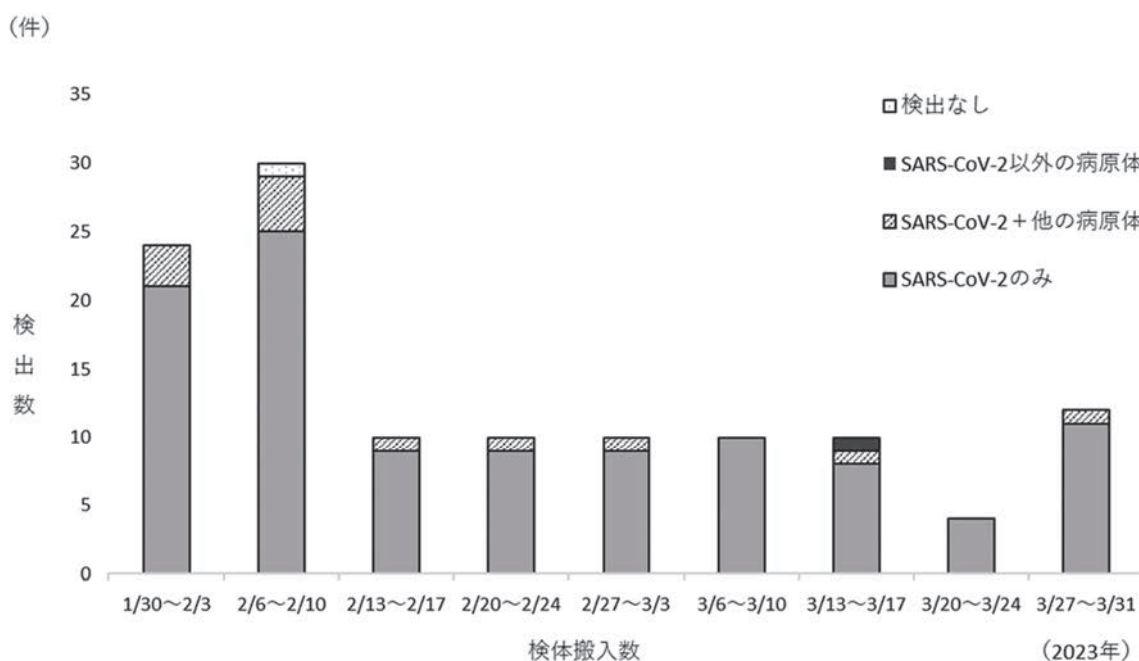


図1. SARS-CoV-2検体における呼吸器パネル検査結果 (週)

量が少ない検体であったか、検体自体の交差反応の可能性が考えられた。

2023年1月30日から2023年3月31日(5~13週)のインフルエンザは定点あたり10~2であったが、呼吸器パネルを実施した新型コロナ搬入検体120検体で、インフルエンザウイルスとの重複検出があったのは4検体(3.3%)に過ぎず、hCoVとの重複検出は8検体(6.7%)あり、インフルエンザウイルスの検出数よりも多かった。また、ライノウイルス/エンテロウイルスやパラインフルエンザウイルス1型の検出も一部でみられた。

以上の結果から、インフルエンザ流行期において、新型コロナ陽性患者検体からのインフルエンザウイルスの同時検出は3.3%と少なく、様々な病原体の検出も確認されたが同様に6.7%と少なかった。

呼吸器パネルを用いた重複感染の探知結果から、新型コロナ陽性患者の重複感染は少ないことがわかった。しかしながら、SARS-CoV-2とインフルエンザウイルスとの重複感染は重症化リスクが高くなるとの報告があり、臨床上の観点から新型コロナ陽性患者の重複感染の探知は重要と考えられる^{14, 15)}。

COVID-19が5類感染症に移行し、感染症防止対策が個人・事業者の状況に応じた自主的な判断と取組が基本となり、イベントの開催制限が緩和され、マスク着用については個人の判断が尊重されるようになった。学校教育活動においては、4月1日以降の新学期におけるマスク着用を求めないことが基本とされた。社会経済活動、生活様式が活発となり、コロナ流行以前の日常を送れるようになったが、流行の抑制がされていた感染症に流行の兆しがみられるようになってきた。乳幼児を中心に流行するRSウイルスや、

ヘルパンギーナは、2023年21週(5/22~)の都内の定点報告数で増加傾向にあり、24週(6/12~)にはヘルパンギーナ感染症は警報レベルに達した¹⁶⁾。インフルエンザにおいても、例年、患者報告数が少なくなる5月以降も報告が続き、2023年25週(6/19~)の都内の定点報告数ではインフルエンザ患者報告数は412人、定点当たり1.00人と報告され、昨年同期の定点当たり0.00人と比べるとこれまでよりも多く、流行が長期化している¹⁶⁾。本研究では、FilmArray呼吸器パネル2.1を利用することで、120検体中、13検体から呼吸器系病原体の重複感染を探知することができた。このような流行状況が絶えず変化する状況下で様々な呼吸器系病原体の重複感染を探知するには、多種類の呼吸器疾患起因病原体を同時に検出できるFilmArray呼吸器パネル2.1の利用は有用と考えられた。

感染症発生动向調査の観点から考えると、COVID-19の中にインフルエンザウイルス感染者やその他のウイルス感染者は少ないことから、SARS-CoV-2の検体を集める場合にはCOVID-19患者検体を積極的に集め、インフルエンザウイルスの検体を集める場合には、インフルエンザ患者由来の検体を集めるべきであると結論づけられた。

ま と め

新型コロナウイルス陽性検体を対象とした変異株スクリーニング検査において、変異株が決定した120検体と呼吸器パネルによる検査結果を比較したところ、呼吸器パネルにおいて118検体からSARS-CoV-2の検出がされた。また、120検体のうち4検体(3.3%)からインフルエンザウイルスが検出され、13検体からSARS-CoV-2以外の病原体が検出された。12検体はSARS-CoV-2との重複検出があ

り、ヒトコロナウイルス、インフルエンザウイルスなど様々な病原体が検出された。

新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行に伴い、社会経済活動、生活様式が活発となり、コロナ流行以前の日常を送れるようになった。一方で、これまでとは流行時期が異なる時期に感染症が流行するなど、絶えず状況は変化している。このような状況下で重症化リスクが想定される重複感染を探知するには、FilmArray呼吸器パネル2.1の利用は有用である。

感染症発生動向調査の観点から考えると、COVID-19の中にインフルエンザウイルス感染者やその他のウイルス感染者は少ないことから、SARS-CoV-2の検体を集める場合にはCOVID-19患者を集め、インフルエンザウイルスの検体を集める場合には、インフルエンザを集めるべきであることが結論づけられた。

文 献

- 1) 厚生労働省：新型コロナ・インフル同時流行対策タスクフォース，
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00400.html (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 2) 東京都政策企画局：新型コロナウイルス感染症に係る東京都の取組，
<http://www.seisakukikaku.metro.tokyo.lg.jp/cross-efforts/corona/torikumi.html> (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 3) 根岸あかね：東京都微生物検査情報，**44**, 1-7, 2023.
- 4) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の5類感染症への変更に伴う主な課題と対応について，
<http://www.mhlw.go.jp/content/10906000/001059902.pdf> (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) 糟谷 文：東京都微生物検査情報，**43**, 1-3, 2022.
- 6) 北村有里恵，熊谷遼太，河上麻美代，他：東京健安研セ年報，**73**, 65-69, 2022.
- 7) 長島真美，熊谷遼太，河上麻美代，他：東京健安研セ年報，**72**, 65-71, 2021.
- 8) 長島真美：東京健安研セ年報，**73**, 15-24, 2022.
- 9) ビオメリュー・ジャパン株式会社：FilmArray呼吸器パネル2.1.
http://info.pmdago.jp/download/ivd/PDF/530633_30200_A_01_02.pdf (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 新開敬行：東京健安研セ年報，**66**, 51-64, 2015.
- 11) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 手足口病，
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/HFMdis20180222.pdf> (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 12) AI-Khannaq M.N., Kim T.O., Xiang Y.O., et al.: *Virology*, 2016.
- 13) Van de Pol A.C., Van Loon A.M., Tom F.W.W., et al.: *J Clin Microbiol.*, 2260-2262, July 2007.
- 14) Kinoshita T., Watanabe K., Sakurai Y., et al.: *Sci. Rep.*, 11:21259, 2021. doi:10.1038/s41598-021-00809-2 (2023年8月25日現在)
- 15) Swets MC., Russell CD., Harrison EM., et al.: *Lancet.*, **399**, 1463-1464, 2022.
- 16) 東京都健康安全研究センター：東京都感染症週報，
<https://idsc.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/weekly/> (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

**Comprehensive Pathogen Searching in SARS-CoV-2 Positive Specimens
using an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection**

Yurie KITAMURA^a, Kenshiro KUROKI^a, Ryota KUMAGAI^a, Sachiko HARADA^a, Hioroyuki ASAKURA^a, Akane NEGISHI^a,
Mamiyo KAWAKAMI^a, Hitoshi ITO^a, Fumi KASUYA^a, Arisa AMANO^a, Shota YOKOTA^a, Yu YAOITA^a,
Wakaba OKADA^a, Miyu KOIZUMI^a, Yukinao HAYASHI^a, Maya ISOGAI^a, Kaori KUZAWA^a,
Michiya HASEGAWA^a, Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a
(Reviewed by Yasuo KABURAGI^b)

In May 2023, SARS-CoV-2 infection (COVID-19) had been moved to a category 5 infectious disease, and individuals and businesses have come to respect the voluntary measures taken to prevent the spread of infectious diseases. As socioeconomic and lifestyle activities increase, people are now able to live a lifestyle similar to that before the coronavirus pandemic. In line with this, epidemics of other respiratory infectious diseases that had been under control could once again showing signs of emergence.

In this study, patient specimens (pharyngeal or throat swabs) brought to the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health between January 30, 2023, and March 31, 2023, that tested positive for SARS-CoV-2 as determined by private laboratories were analyzed for co-infection between SARS-CoV-2 and influenza viruses, as well as overlapping infections with other pathogens. We searched for pathogens in specimens that tested positive for SARS-CoV-2, influenza viruses, and other pathogens using the nucleic acid multiplexing reagent, FilmArray Respiratory Panel 2.1.

Our results showed that among the 120 targeted samples, analyzed, 4 (3.3%) had the influenza virus, and 8 (6.6%) had duplicate detection with human coronavirus, suggesting that the use of the FilmArray Respiratory Panel 2.1 is suitable for the comprehensive detection of various respiratory pathogens. It is unlikely that COVID-19 patients would be infected with influenza virus or other viruses. This study concludes that specimens should be collected based on the corresponding conduction to be tested SARS-CoV-2 specimens for COVID-19 and influenza virus specimens for influenza virus from the standpoint of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases Program.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, influenza virus, co-infection

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

^b Saitama City Institute of Health Science and Research