

資 料

## 岐阜県保健環境研究所における新型コロナウイルス感染症の検査対応

浦本雄大, 葛口 剛, 西岡真弘, 丸山友美\*, 野田万希子, 小池紀子, 越 勝男, 桐井久美子, 門倉由紀子\*\*, 林 佐代子\*\*\*, 水野卓也, 岩間英里, 山口智博, 佐藤容平\*\*\*\*, 内藤菜月\*\*\*\*\*, 伊藤広泰\*\*\*\*\*, 遠藤利加, 廣澤智子\*\*\*\*\*, 志水美奈, 横山あかね, 林 典子, 後藤 睦, 栗本喜普, 宮川紀子\*\*, 藤井 優\*\*, 亀山芳彦

### 要 旨

岐阜県保健環境研究所 (以下当所) では2020年2月6日よりリアルタイムPCR法での新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の検査を開始し, 2021年3月31日までに陰性確認も含め31,493検体の検査を行った。検査数の増加に伴い, 短時間でより多くの検体を検査することが求められ, 検査法や試薬の変更, 外部機関への検査委託等によりその対応に努めた。検査開始当初はRNA抽出を行い, それをテンプレートとして検査を行っていたが, 簡易抽出型のリアルタイムPCRキットが販売されたことによりさらに効率的に検査を行えるようになった。

キーワード: 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19), リアルタイムPCR法

#### 1 はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症で, 2019年12月以降, 中国湖北省武漢市を中心に発生し, 短期間で全世界に広がった<sup>1)</sup>。日本国内では2020年1月16日に最初の感染者が報告され, 当所においても2020年2月26日に初めての陽性例を報告した。本稿では初めて検査を開始した2020年2月6日から2021年3月末までの当所での検査対応について報告する。

#### 2 検査体制の整備と検査の流れ

2020年1月24日に国立感染症研究所より病原体検出マニュアル2019-nCoVver.1, 2020年1月28日に同マニュアルのver.2.1が配布され, 当所でも2つの検査法のワークシートの作成と検討を行った。1つ目は新型コロナウイルスのopen reading frame 1a (ORF1a)及びspike (S遺伝子)と呼ばれる2カ所の遺伝子領域をその領域に特異的なプライマーセットを用いて2-step RT-PCRにより増幅し, 電気泳動により同定するコンベンショナルPCR法。2つ目は新型コロナウイルスのヌクレオカプシド(N遺伝子)中のN1, N2と呼ばれる2カ所の遺伝子領域に特異的なプライマー・プローブセ

ット(Nセット, N2セット)を用いて定量的に検出するリアルタイムPCR法である (図1)。

検査人員についてはコンベンショナルPCR法でPCRを行う試薬担当, RNA抽出を行う検体担当, 電気泳動担当の3名, リアルタイムPCR法でも試薬担当, 検体担当, Positive Control調製担当の3名とした。

2つの検査法の整備を行ったが, 検査時間やコンタミネーションの可能性を考慮し, リアルタイムPCR法での検査を2020年2月6日より開始した。

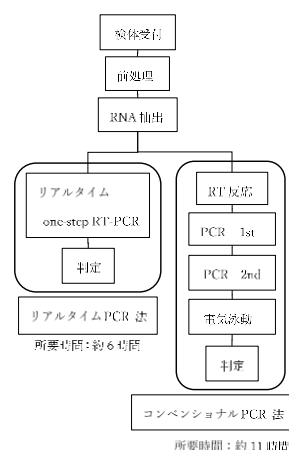
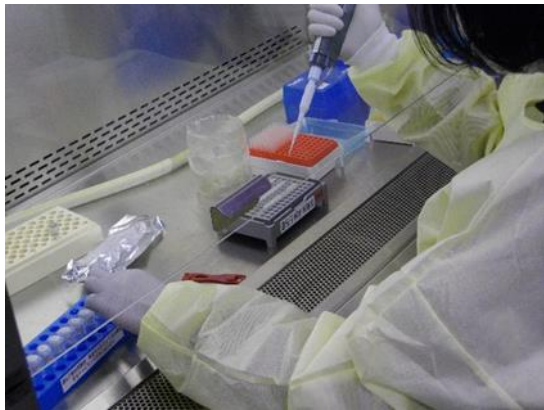


図1 検査開始時の当所での検査の流れ

岐阜県保健環境研究所: 504-0838 岐阜県各務原市那加不動丘 1-1, \*現 岐阜県飛騨保健所: 506-8688 岐阜県高山市上岡本町 7-468, \*\*現 岐阜県西濃保健所: 503-0838 岐阜県大垣市江崎町 422-3, \*\*\*現 岐阜県可茂保健所: 505-8508 岐阜県美濃加茂市古井町下古井 2610-1, \*\*\*\*現 岐阜県中央食肉衛生検査所: 503-0015 岐阜県大垣市林町 3-167-1, \*\*\*\*\*現 岐阜県保健福祉部感染症対策推進課: 500-8570 岐阜県岐阜市藪田南 2-1-1, \*\*\*\*\*現 岐阜県教育委員会体育健康課: 500-8570 岐阜市藪田南 2-1-1



BSL3 内での検体の前処理



PCR 試薬への検体のアプライ

### 3 増加する検査への対応

2020年3月4日にクルーズ船患者の地元移送に伴う陰性確認検査の開始、2020年3月22日には県内初のクラスターの発生が確認され、日を追うごとに検体数が増加した。全国への緊急事態宣言により検査数は一時減少したが解除後にまた増加することになった。特に2020年11月から2021年1月中旬にかけて検査数が急増した(図2)。それに伴い、県庁及び保健所に勤務する臨床検査技師及び獣医師の兼務、社会人経験者枠での臨床検査技師の採用による検査員の増員が行われ、平日は3回、土日祝日は2回検査を行えるようにシフトを組み対応した。また、岐阜市衛生試験所や民間検査会社への検査委託を行い、2021年3月31日までに6,598検体を委託した。

### 4 検査法、試薬の変更

当所では検査数の増加に伴い、検査時間の短縮や処理できる検体数も増やすことを目的として検査法、試薬の変更を3回行った。

最初はNセットとN2セット両方の増幅を確認していたところをN2セットのみの確認に変更した。陽性率がNセットよりもN2セットの方が高く、N2セット

のみで検査を行った場合に検出感度の低下が限定的であることが国立感染症研究所から示されたためである<sup>2)</sup>。その結果、1回に検査可能な最大数が22検体から46検体となり、PCR試薬の調製や検体のアプライの手順も簡素化することができた。

次に QuantiTect Probe RT-PCR Kit 【QIAGEN】(以後 QIAGEN 社製 Kit) から One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 【TaKaRa Bio】(以後 TaKaRa 社製 Kit) へ試薬の変更を行った。変更するにあたっての検出感度の検証では、国立感染症研究所から配布された陽性コントロールを4系列(10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>/μL)の濃度に希釈してN=2で評価を行った。また、TaKaRa 社製 Kit のプロトコルではROX補正を必要とする機器にはROX試薬を添加するようになっており、当所ではどちらの機器も所有していたことから試薬調製時のミスを防止するためにROX補正を必要としない機器に対してROX試薬添加による検査結果への影響の検証も行った。検出感度の検証では50copies/5μLが安定的に検出されればよい<sup>3)</sup>という基準を満たすことが確認できた(表1)。また、ROX添加による結果への影響がないことも確認されたため、どちらの機器で検査を行う場合でもROX試薬を添加する試薬組成とした。

2つの試薬ではリアルタイムPCR中の反応条件に違いがあり、TaKaRa 社製 Kit の反応時間はQIAGEN 社製 Kit の約3分の1であった。そのため、試薬の変更により検査時間を2時間程度短縮することができた。また、試薬の価格もTaKaRa 社製 Kit が安価であるためコスト削減にも繋がった。

最後はTaKaRa 社製 Kit から SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit 【TaKaRa】(以後 TaKaRa Direct Kit) への試薬の変更である。TaKaRa Direct Kit の特徴はRNA抽出を必要としない簡易抽出型というところである。簡易抽出は処理が10分程度で終わるため、検査時間をさらに短縮することができた。また、TaKaRa Direct Kit に変更後の2020年12月9日には、検出感度上問題ないと判断し、1検体につき2ウェルで行っていた測定を1ウェルでの測定とした。これにより1回の検査での最大数が92検体となった。

表1 検出感度の評価

コピー数/5μL	Ct値			
	Nセット		N2セット	
5	39.93	39.93	35.67	35.96
50	37.75	36.39	34.09	34.12
500	33.67	33.89	30.71	30.54
5000	30.328	30.52	26.96	26.95

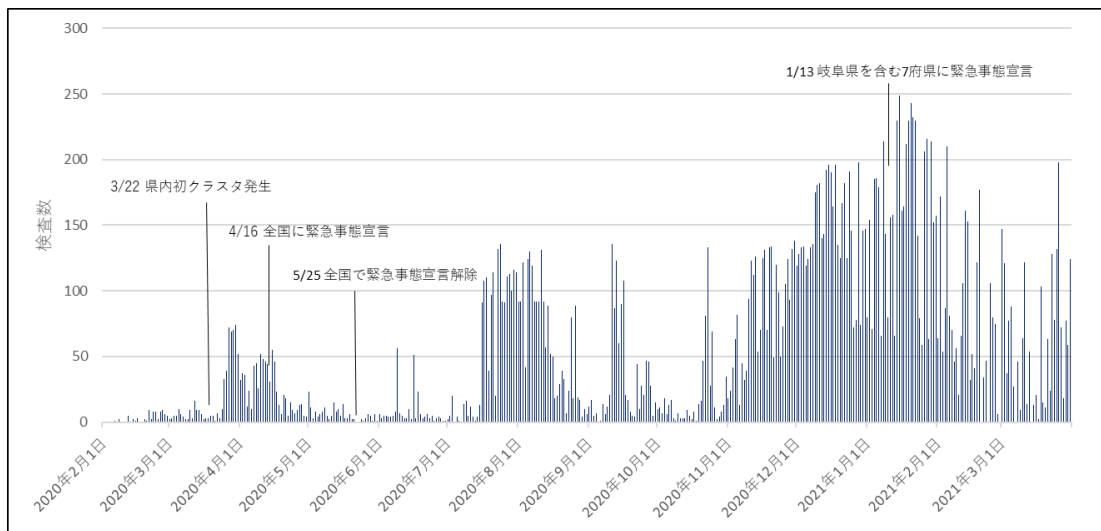


図2 当所における1日ごとの検査数の推移

5 検査結果について

2020年2月6日から2021年3月31日までに検査委託をした検体も含めると31,120検体の検査と373検体の陰性確認を行った。陰性確認を除いた陽性者数の推移は第1波から第3波にかけて増加しており2021年の1週目に105名、2週目に96名、3週目に147名と3週連続で90名を超える陽性者を確認した(図3)。また2020年2月から2020年5月までを第1波、2020年6月から2020年10月までを第2波、2020年11月から2021年3月までを第3波と区分し、保健所ごとの陽性者数を見てみると第1波では岐阜保健所26名、第2波では可茂保健所83名、第3波では岐阜保健所225名、西濃保健所248名、可茂保健所で277名と多い傾向にあった。また、全ての期間を通して恵那保健所が52名、飛騨保健所が24名と少ない傾向であった。10万人あたりの陽性者数においては可茂保健所が169.7名と最も多く、飛騨保健所が16.9名で最も少ない傾向にあった(図4)。年代別の陽性者数では20代が234名で最も多く、次いで30代が187名となるなど、20代をピークとする一峰性のグラフが描ける結果となった(図5)。20代が最多となった1つの要因として大学内でのクラスターが多数発生したことが考えられる。

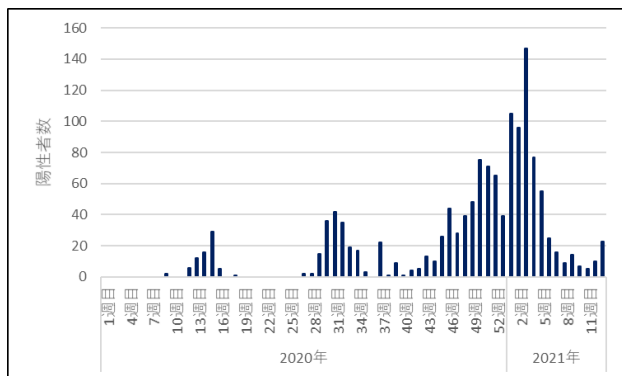


図3 当所における週ごとの陽性者数の推移

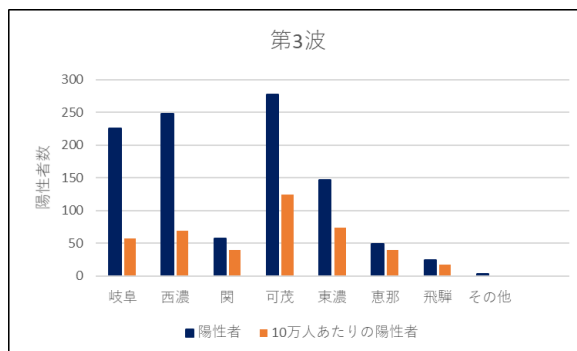
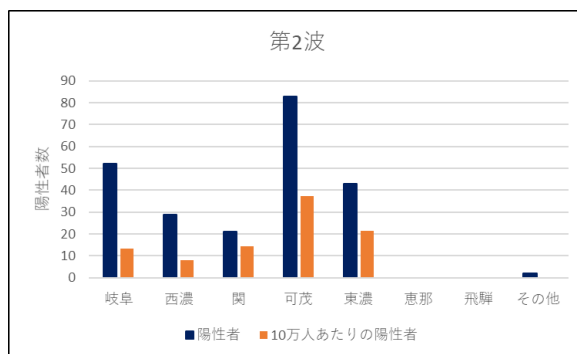
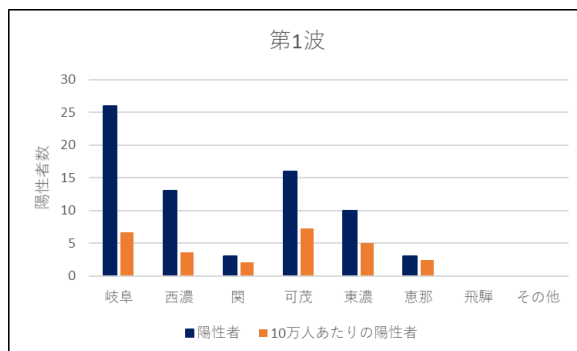


図4 保健所別の陽性者数\*

\*岐阜市保健所は岐阜市衛生試験所にて検査を実施しているため除外

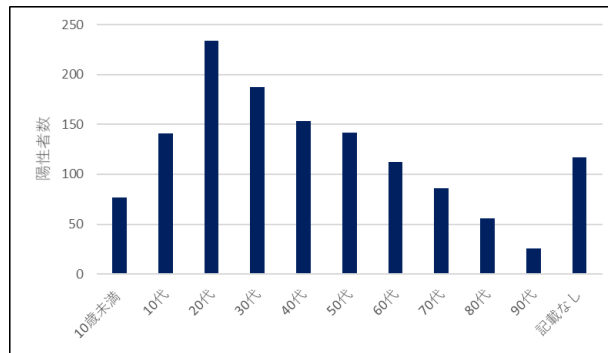


図5 当所における年代別の陽性者数

## 6 検査対応を通じた課題

岐阜県内においてもこれまでに例を見ないほど感染が広がり、それに伴い検査数も増加した。当所では検査法や試薬の変更を行い、短時間でより多くの検体を処理できるように努めてきた。そのような中で最大の懸案となったのが世界的な消耗品の不足だった。メーカーや納入代理店の協力もあり、検査不能となる状況は回避できたものの、検査時間の延長を余儀なくされた。検査工程に検体を2,000rpmで20分遠心する前処理工程が含まれており、検査開始当初に使用していた検体輸送用チューブであれば1度で56本の検体を処理することができていた。しかし、プラスチック製品の供給不足によりそのチューブを入手することが困難となり、別のチューブで代用することになった。その代用品は従前品よりも太いため、当所所有の遠心機では1度に20本しか遠心できず、処理速度を大きく落としてしまうことになった。今後このような事態が起きた場合、消耗品が安定的に供給されない事態も想定し、普段から備蓄を増やしておく等の対策が必要となる。また、どんな状況においても検査を継続できるように1つだけでなく複数の検査系を用意しておく必要があると考えられる。

## 謝辞

今回の新型コロナウイルス感染症検査に対応いただいた各保健所および各医療機関、県庁各課の皆様に深謝いたします。

## 文献

- 1) Medical Note 新型コロナウイルス感染症について  
<https://medicalnote.jp>
- 2) 国立感染症研究所：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）検査法の運用についてのガイドライン 第3版, p1

[https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/COVID-19-PCR-test-practical\\_R3.pdf](https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/COVID-19-PCR-test-practical_R3.pdf)

- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver 2.9.2, p11.

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>

## COVID-19 tests at Gifu Prefecture in 2020

Yuta URAMOTO, Tsuyoshi KUZUGUCHI, Masahiro NISHIOKA, Tomomi MARUYAMA\*, Makiko NODA,  
Noriko KOIKE, Katsuo KOSHI, Kumiko KIRII, Yukiko KADOKURA\*\*, Sayoko HAYASHI\*\*\*,  
Takuya MIZUNO, Eri IWAMA, Tomohiro YAMAGUCHI, Yohei SATO\*\*\*\*, Natsuki NAITO\*\*\*\*\*,  
Kodai ITO\*\*\*\*\*, Rika ENDO, Tomoko HIROSAWA\*\*\*\*\*, Mina SHIMIZU, Akane YOKOYAMA,  
Noriko HAYASHI, Yoshihiro KURIMOTO, Mutsumi GOTO, Noriko MIYAKAWA\*\*, Yu FUJII\*\*,  
Yoshihiko KAMEYAMA

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:*

*1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan*

*\* Hida Region Public Health Center:*

*Hida General Government Building, 7-468, Kamiokamoto, Takayama, Gifu 506-8688, Japan*

*\*\* Seino Region Public Health Center:*

*Seino General Government Building, 422-3, Ezaki, Oogaki, Gifu 503-0838, Japan*

*\*\*\* Kamo Region Public Health Center:*

*Kamo General Government Building, 2610-1, Shimokobi, Kobi, Minokamo, Gifu 505-8508, Japan*

*\*\*\*\* Chuo Meat Inspection Office: 3-167-1, Hayashi, Oogaki, Gifu 503-0015, Japan*

*\*\*\*\*\* Infection Disease Provention Promotion Division: 2-1-1, Yabutaminami, Gifu, Gifu 500-8570, Japan*

*\*\*\*\*\* Physical Education and Health Division : 2-1-1, Yabutaminami, Gifu, Gifu 500-8570, Japan*