

# 京都府における新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のリアルタイム PCR検査状況とSARS-CoV-2陽性例の疫学的特徴 (第2報)

河原 佳幸 藤本 恭史 小寺 明 岩崎 里菜 永田 瑞絵 浅井 紀夫

Surveillance of Real-time RT-PCR Testing of Novel Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) and Epidemiological Characteristics of SARS-CoV-2 Positive Cases in Kyoto (2nd Report)

Yoshiyuki KAWAHARA Yasushi FUJIMOTO Akira KOTERA  
Rina IWASAKI Mizue EITA Norio ASAI

前報に引き続き、2020年4月1日から2021年3月31日までに当所又は中丹西保健所に搬入されたCOVID-19疑いの19,563検体について、リアルタイムRT-PCR法によりSARS-CoV-2検査を実施した。その結果を用いて府内におけるCOVID-19の流行について、陽性者数や陽性率の推移を解析し、感染拡大の原因を考察した。月ごとの検体数、陽性数及び陽性率については、全国の状況と同様の傾向が見られた。検体数及び陽性者数は年間を通じて府南部地域（山城北、山城南、乙訓、南丹地域）が全体の8割程度を占めていた。第三波のピークとなる2020年12月及び2021年1月に高い陽性率を示したことから、感染拡大の原因を調査するため、検体を『疑似症検体』、『家族等検体』及び『クラスター疑い検体』の3つに分類し、属性ごとに陽性率を比較した。第三波感染拡大前の2020年9月から10月にかけて『家族等検体』の陽性率が増加した後、10月から11月にかけて『疑似症検体』、11月から12月にかけて『クラスター疑い検体』の陽性率がそれぞれ増加したため、家庭内感染が感染拡大の起点であると推測された。国立感染症研究所が実施した次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム解析結果を用いて、流行した株の特定及び分子疫学的特徴について検討した。陽性率の高かった第三波のピークとなった2021年1月から収束期の3月までに府内で陽性となった123検体について、Pangolin系統解析を行った結果、B.1.1.214系統が92検体（75%）、B.1.1.7系統（アルファ株）が28検体（23%）及びR.1系統が3検体（2%）の3系統に分類された。また、ハプロタイプネットワーク解析及び系統樹解析を行ったところ同様に3つの系統に分類された。第三波の中心は1月及び2月において全体の約90%を占めたB.1.1.214系統であり、全国と同様の傾向を示した。しかし、第三波の収束後である3月からは、B.1.1.214系統からの置き換わりが進み、アルファ株の急激な増加が認められ、2021年4月以降の感染拡大につながった。R.1系統は散発的な発生であり、府内の感染拡大に大きな影響を与えなかったと推測される。

キーワード：新型コロナウイルス、リアルタイムRT-PCR、次世代シーケンス、ゲノム解析  
Keywords：SARS-CoV-2, Real-time RT-PCR, Next generation sequencing, Genome analysis

## はじめに

2019年12月、中華人民共和国湖北省武漢市で原因不明の肺炎症例が多発し、患者検体から新型コロナウイルス（SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2）が検出された。その後新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行は全世界へ広がり、2021年12月現在未だに感染拡大を続けており、COVID-19の感染状況を把握し、感染拡大を防止するため、各地方自治体、医療機関及び民間検査機関等では様々な検査体制が確立され、SARS-CoV-2検査を行っている。

当所においても2020年1月30日にリアルタイムRT-PCR法による検査体制を構築し、府内（京都市を除く）の患者や濃厚接触者の検査を進めていたが、COVID-19の長期的な流行を見据えて検査人員の増加を図るとともに、2020年5月18日には中丹西保健所の検査体制を構築し、府の検査体制を強化した。

前報<sup>1)</sup>では、京都府初のCOVID-19疑い患者の発生した2020年2月8日から2020年3月31日までにリアルタイムRT-PCR法による検査を行った719検体について疫学的知見を報告した。本報では引き続き2020年4月1日から2021年3月31日まで当所及び中丹西保健所において19,563検体の検査を実施したので、府内におけるCOVID-19の流行について、検体数や陽性率の推移を解析した。

一本鎖プラス鎖のRNAウイルスであるSARS-CoV-2は、Next Strain (<https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?!=clock>)によると年間約24~25塩基/ゲノムの塩基変異速度を示すウイルスである。変異の多くは中立的に発生し、ウイルスの性状には大きな変化を来さないと想定されている<sup>2)</sup>。しかし、宿主細胞のACE2受容体に結合するスパイクタンパク質の変異の中には、感染性、病原性（重症化）や免疫回避（ワクチン効果の低下など）に大きく影響を与えるものが存在する可能性が報告されており<sup>3-6)</sup>、影響度の高い変異株は、世界保健機関（WHO）及び国立感染症研究所において「懸念される変異株（VOC）」又は「注目すべき変異株（VOI）」に指定されている。そこで国立感染症研究所が実施した次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム解析結果を基に、府内における

（令和4年1月5日受理）

流行株の変遷を調査するとともに、感染拡大の状況について分子疫学的に検討した。

## 材料と方法

### 1. 材料

2020年4月1日から2021年3月31日までに当所に搬入された18,151検体及び2020年5月18日から2021年3月31日までに中丹西保健所に搬入された1,412検体の合計19,563検体を検査材料とした。なお、対象検体は症状のある疑似症検体と陽性者の濃厚接触者検体に大別され、検体種別は鼻咽頭ぬぐい液、唾液又は喀痰とした。

また、2021年1月から3月までに当所等の検査で陽性となった452検体のうち、国立感染症研究所による次世代シーケンサー（NGS）を用いたゲノム解析で全ゲノム配列を確定できた123検体（27%）（鼻咽頭ぬぐい液又は唾液）について、分子疫学解析の検査材料とした。

### 2. 方法

#### 2-1. リアルタイムRT-PCR法によるSARS-CoV-2検査

前報<sup>1)</sup>と同様に国立感染症研究所が公開する病原体検出マニュアル (<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) に記載のリアルタイム RT-PCR法<sup>7)</sup>に従い、検査を行った。1日の検査件数が80件を超える場合等は、株式会社島津製作所製のAmpdirect™ 2019-nCoV検出キットを用いて、添付説明書 (<https://www.shimadzu.co.jp/reagents/covid-19/index.html>) のとおり検査を行った。

#### 2-2. 次世代シーケンサー（NGS）の結果を用いた分子疫学解析

国立感染症研究所のNGS解析で得られたSARS-CoV-2の遺伝子配列を用いて、SARS-CoV-2に関して世界共通の系統分類方法であるPangolin (COVID-19 Lineage Assigner Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINeages) により系統分類を行った (<https://pangolin.coguk.io/>)。さらに、PopArt version 1.7<sup>8)</sup>でMedian-joining-network法によりハプロタイプネットワーク図、MEGA11<sup>9)</sup>でNeighbor-joining法を用いて系統樹を作成した。なお、参照配列（REF）としてWuhan-Hu-1（GenBank: MN908947）を用いた。

## 結果と考察

### 1. リアルタイムRT-PCR法の結果を用いた疫学解析

#### 1-1. 検体数、陽性者数及び陽性率の推移

当所及び中丹西保健所で実施したSARS-CoV-2 リアルタイムRT-PCR検査における地域別検体数の月別推移を図1、陽性者数の月別推移を図2、陽性率の月別推移を図3にそれぞれ示す。2020年4月16日から5月21日まで本府に緊急事態宣言が発出され、図1のとおり5月及び6月の検体数はそれぞれ300検体以下となった。しかし、7月から8月にかけて検

体数が急増し、月2,000検体弱もの検体が搬入された。10月に若干減少したが、12月に3,500検体、1月に4,600検体を超え、検体数の急激な増加が見られた。2021年1月14日から2月28日まで本府に2度目の緊急事態宣言が発出され、2月には700検体、3月には300検体程度と、急激に減少した。年間を通じて府南部地域（山城北、山城南、乙訓、南丹保健所管内）が全体の約8割を占めており、南部地域の方が北部地域（中丹東、中丹西、丹後保健所管内）より検体数が多かった。丹後保健所管内では11月～2月に一時的に検体数が増加した

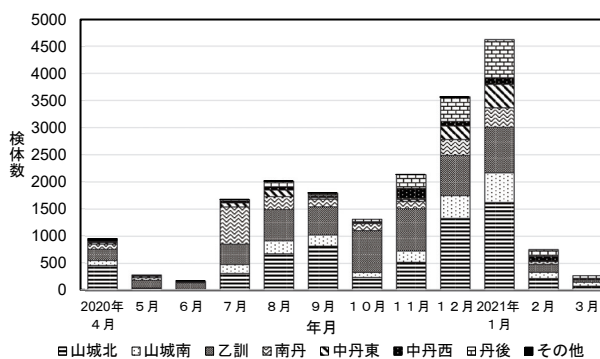


図1. SARS-CoV-2リアルタイムRT-PCR検査における地域別検体数の月別推移

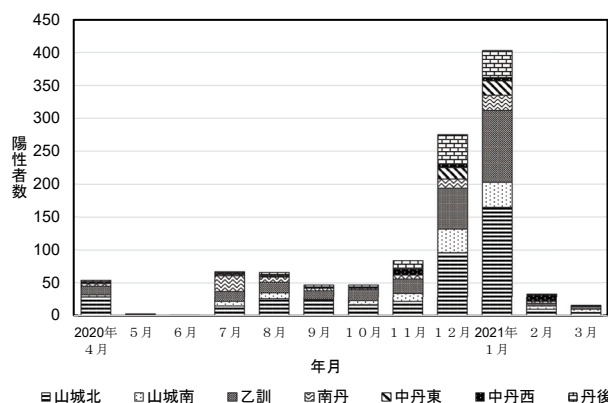


図2. SARS-CoV-2 リアルタイムRT-PCR検査における陽性者数の月別推移

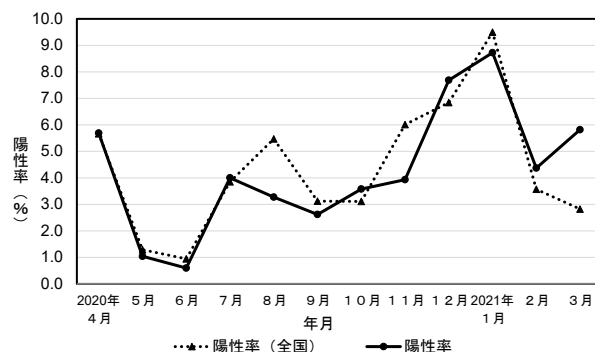


図3. SARS-CoV-2 リアルタイムRT-PCR検査における陽性率の月別推移

注) 陽性率（全国）は厚生労働省のオープンデータ (<https://www.mhlw.go.jp/stf/covid-19/open-data.html>) から算出

が、クラスター疑い事例が複数発生したことが原因であった。陽性者数(図2)は検体数と同様のパターンを示し、7月から横ばいで推移していたが、12月、1月は11月のそれぞれ3倍、5倍になった。陽性率(図3)は7月に4.0%となり、11月まで同程度で推移していたが、12月に7.7%、1月に8.7%と高い値を示した。全国の陽性率も同様の月別推移傾向であり、概ね当所の検査状況と一致した。

1-2. 検体属性ごとの検体数及び陽性率の月別推移

陽性率は国や各都道府県の感染の状況を示す重要な指標の一つである。感染拡大の経緯を調査するため、検体を症状のある患者検体(『疑似症検体』)、症状がない家族等の少数の濃厚接触者検体(『家族等検体』)及び施設等における多数の濃厚接触者検体(『クラスター疑い検体』)の3つの属性に区分した。属性別の検体数及び陽性率の月別推移について図4に示す。2020年4月に50%程度を占めていた『疑似症検体』の検体数は、病院や民間検査機関等の検査体制が整備されたことで徐々に減少した。当所及び中丹西保健所における検査では9月以降『家族等検体』と『クラスター疑い検体』の検体数が80%以上を占めるようになった。9月から10月にかけて『家族等検体』陽性率が5.5%から10.6%と倍以上になった。さらに、『疑似症検体』陽性率が10月から11月にかけて3.8%から10.6%と3倍弱になり、『クラスター疑い検体』陽性率が11月から12月の0.9%から4.2%と4倍以上になった。第三波の流行とされる11月の1ヶ月前から接触が濃いと考えられる家族等の間での流行が認められ、家族等を起点に徐々に市中感染が広がっていった可能性が推測された。一方、2021年1月から2月にかけて、陽性者が減少するにつれ『疑似症検体』及び『クラスター疑い検体』の陽性率も低下し、3月には『家族等検体』の陽性率が低下し、流行は収束した。

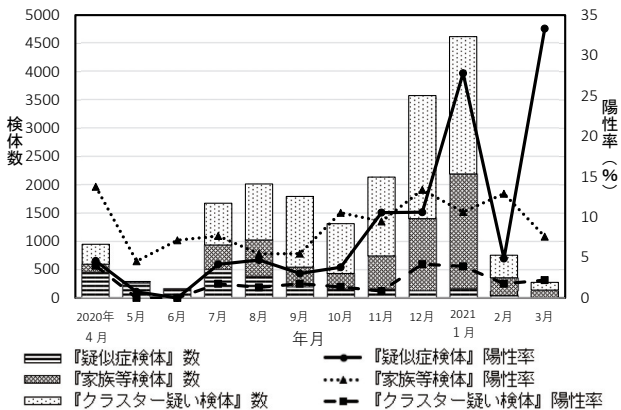


図4. 検体属性ごとの検体数及び陽性率の月別推移

2. NGSの結果を用いた分子疫学解析

2-1. Pangolin系統解析による変異株の推移

陽性率の高かった感染流行期の2021年1月から収束期の3月までに府内で陽性となった123検体について、国立感染症研究所によるNGS結果を元にPangolin系統解析を行った。各月におけるPangolin系統別の検体数を図5、系統別の割合を

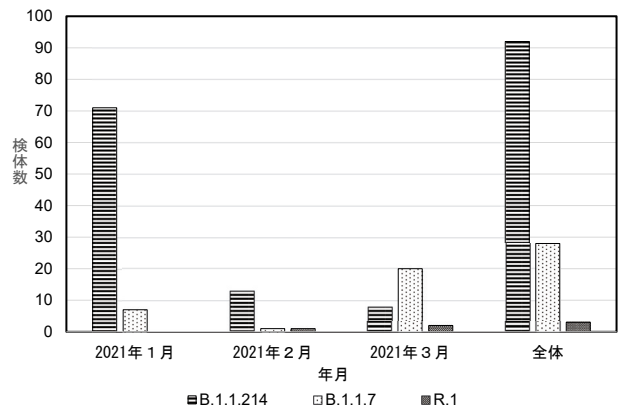


図5. 府内のSARS-CoV-2陽性株に係るPangolin系統別の検体数(2021年1月~3月)

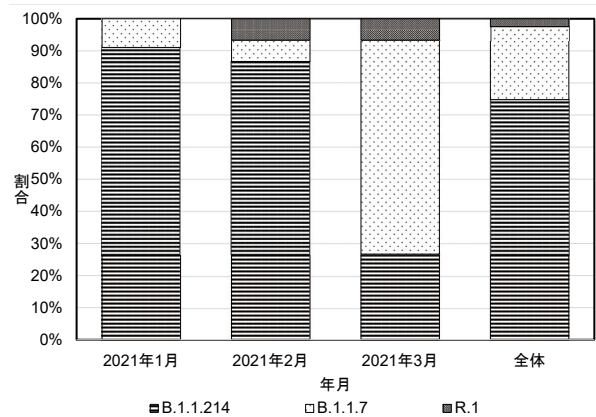


図6. 府内のSARS-CoV-2陽性株に係るPangolin系統別の割合(2021年1月~3月)

図6にそれぞれに示す。B.1.1.214系統が92検体(75%)、B.1.1.7系統(アルファ株)が28検体(23%)及びR.1系統が3検体(2%)の3系統に分類された。

B.1.1.214系統はスパイクタンパク質にD614G変異を有している2020年3月~4月に流行した欧州系統由来の株で、第三波で全国的に主流となった系統の一つである<sup>2)</sup>。図6から府内においても1月は91%、2月は87%を占め、この系統が最も流行していたことが示唆された。しかし、3月には27%にまで急減し、4月以降この系統による感染は収束した。

B.1.1.7系統(アルファ株)はスパイクタンパク質にN501Y変異等の多重変異を有しており、感染性・伝播のしやすさ等から国立感染症研究所によりVOCに指定されている(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/10220-covid19-36.html>)。アルファ株は従来株に比較して実効再生産数が43-90%高く<sup>10)</sup>、感染すると死亡リスクが55%上昇するとされている<sup>11)</sup>。府内では1月に最初の流入が認められたが、その後消失したことから封じ込めに成功し、第三波における出現は少なく、影響は少なかったと推測された。しかし、3月から急激に割合が増加し、第四波の流行につながった。

R.1系統は、3月頃から主に関東地方と東北地方で流行し始めた系統であり、スパイクタンパク質に免疫逃避を引き起こす可能性のあるE484K変異を有しているため、国立感染症研究所からVOIに指定されていた(<https://www.niid>).



go.jp/niid/ja/2019-ncov/2484-idsc/10280-covid19-41.html)が、2021年7月17日に指定解除となった (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2484-idsc/10530-covid19-50.html>)。府内では2月に初めて流入が認められたが、本研究においては3検体のみの検出であり、府内の感染拡大には大きな影響がなかったと推測された。

## 2-2. ハプロタイプネットワーク解析及び系統樹解析による府内の感染状況

塩基変異を基にウイルス株間の関係を示すハプロタイプネットワーク解析及び系統樹解析を行い、ハプロタイプネットワーク図を図7に、系統樹を図8にそれぞれ示す。Pangolin系統解析と同様にハプロタイプネットワーク図及び系統樹においても大きく3つの系統に分けられた。図7で複数の感染リンクが認められ、市中感染が疑われるグループを『グループ1～3』、疫学情報から3名以上で形成されるクラスターを『クラスターA～H』に区分し、Pangolin系統別に府内の感染拡大への影響について検討した。

B.1.1.214系統は2021年1月以前より全国で流行しており<sup>2)</sup>、本研究では図7において、この系統の出発点となる起点aの株は検出されなかったが、起点aから派生したグループ1のIとII、グループ2のIIIからいずれも5つ以上の分岐が認められた。しかし、疫学情報からグループ1及びグループ2においては、クラスター及び同一家族を除き患者間の関連はなかったため、感染リンクは市中感染によるものと考えられた。国立感染症研究所のCOVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP) から、グループ1及びグループ2に属するものは、主に関西地方で流行した株及びその派生型であることが分かった。グループ1及びグループ2においては都市部近傍で人流の影響を受けやすい府南部地域の検体が90%を占めていたため、これらのグループが市中感染に大きな影響を与えたと推測された。一方、B.1.1.214系統において、北部地域の検体は20%のみであること、感染リンクが少ないことから他地域からウイルスが持ち込まれ、家族感染又はクラスターが散発的に発生したが、市中感染の影響は少なかったと推測される。クラスターA～Gは、図7において各クラスター内で0～3塩基が変異していたが、図8からそれぞれ独立したクラスターであり、クラスター同士の関連性は疑われなかった。図7においてその後の感染リンクがないことから、クラスターA～Gを起点とした市中への感染拡大はなかったと推測された。

第三波の収束後の2021年3月にB.1.1.214系統が減少する一方、アルファ株が急増した。図7においてアルファ株の起点bと起点bから分岐した株では遺伝的な関連はあるが、疫学情報から発生時期が異なっているため直接的な感染ではなく、別のルートで他地域から流入したと推測された。起点bから分岐した同一家族やクラスターH等は、その後の感染リンクがみられず、散発的な事例に終わったと推測される。しかし、グループ3に含まれる株は、国立感染症研究所のCOG-JPによると関西地方で流行した株及びその派生型と一致した。アルファ株は96%が府南部地域の検体であったこと

から、B.1.1.214系統と同様にグループ3の系統が市中感染に影響し、南部地域から広がったことで第四波のアルファ株の流行につながったと推測された。

R.1系統については本研究では図7のこの系統の出発点となる起点cが検出されず、起点cから派生した3検体もいずれも散発的でその後の感染リンクがなかったため、府内における感染拡大に大きな影響はなかったと推測される。

今回のゲノム情報を利用した大規模な分子疫学解析は、本府において初めての試みであり、これにより府内におけるSARS-CoV-2系統の変遷及び感染拡大の様式が明らかとなった。引き続きデータ収集及び解析を進め、本府の感染症対策に役立てたい。

## 謝辞

本稿をまとめるにあたり、多くの有益な助言を頂いた京都府立医科大学大学院医学研究科感染病態学教室中屋隆明教授、大道寺智講師、西岡敬介助教、NGSの実施及び解析にあたり御協力いただいた国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの皆様及び検査の支援をいただいた中丹西保健所食肉・試験検査課、本研究所の理化学課、水質・環境課、大気課の皆様へ深謝いたします。

## 引用文献

- 1) 永田瑞絵, 藤本恭史, 長谷川和宏, 岩崎里菜, 藤本直樹. 2020. 京都府における新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のリアルタイムPCR検査状況とSARS-CoV-2陽性例の疫学的特徴 (第1報). 京都府保健環境研究所年報, 65, 1-5.
- 2) 関塚剛史, 糸川健太郎, 谷津弘仁, 田中里奈, 衛藤阜, 染野里紗, 橋野正紀, 黒田誠. 2021. 新型コロナウイルスSARS-CoV-2ゲノム情報による分子疫学調査 (2021年1月14日現在). 病原微生物検出情報 (IASR), 42, 61-64.
- 3) Groves D.C., Rowland-Jones S.L., Angyal A. 2021. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 538, 104-107.
- 4) Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., Pearson C.A.B., Russell T.W., Tully D.C., Washburne A.D., Wenseleers T., Gimma A., Waites W., Wong K. L.M., van Zandvoort K., Silverman J.D., CMMID COVID-19 Working Group, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz K., Keogh R., Eggo R.M., Funk S., Jit M., Atkins K.E., Edmunds W.J. 2021. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 372 (6538), 3055.

B.1.1.214系統

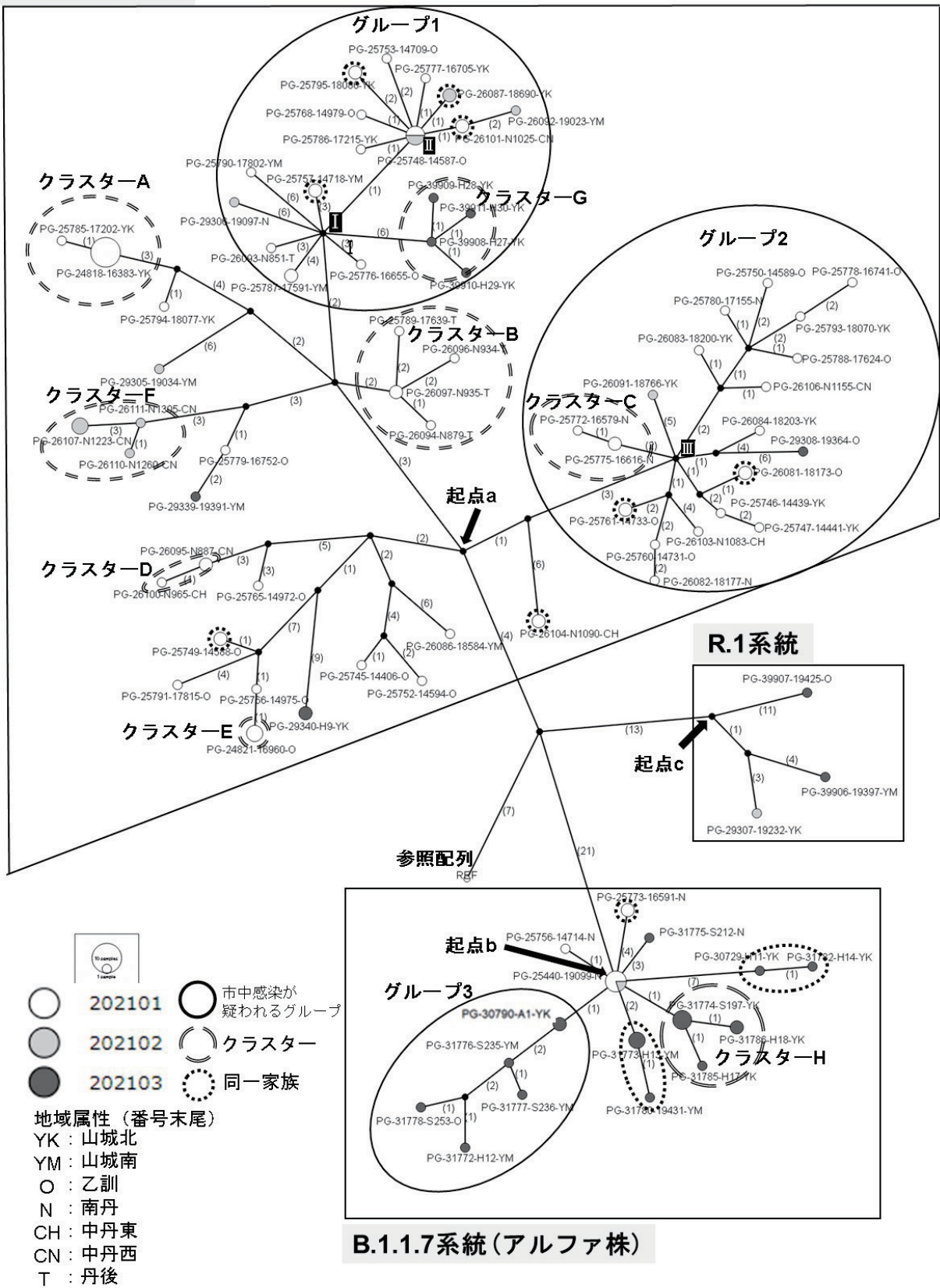


図7. 府内のSARS-CoV-2陽性株に係るハプロタイプネットワーク図 (2021年1月~3月)

注) 検体表記は「国立感染症研究所のPG番号-当所等の検体番号-地域」、( )の数字は塩基の相違数、●は分岐元と推測される株を示す。

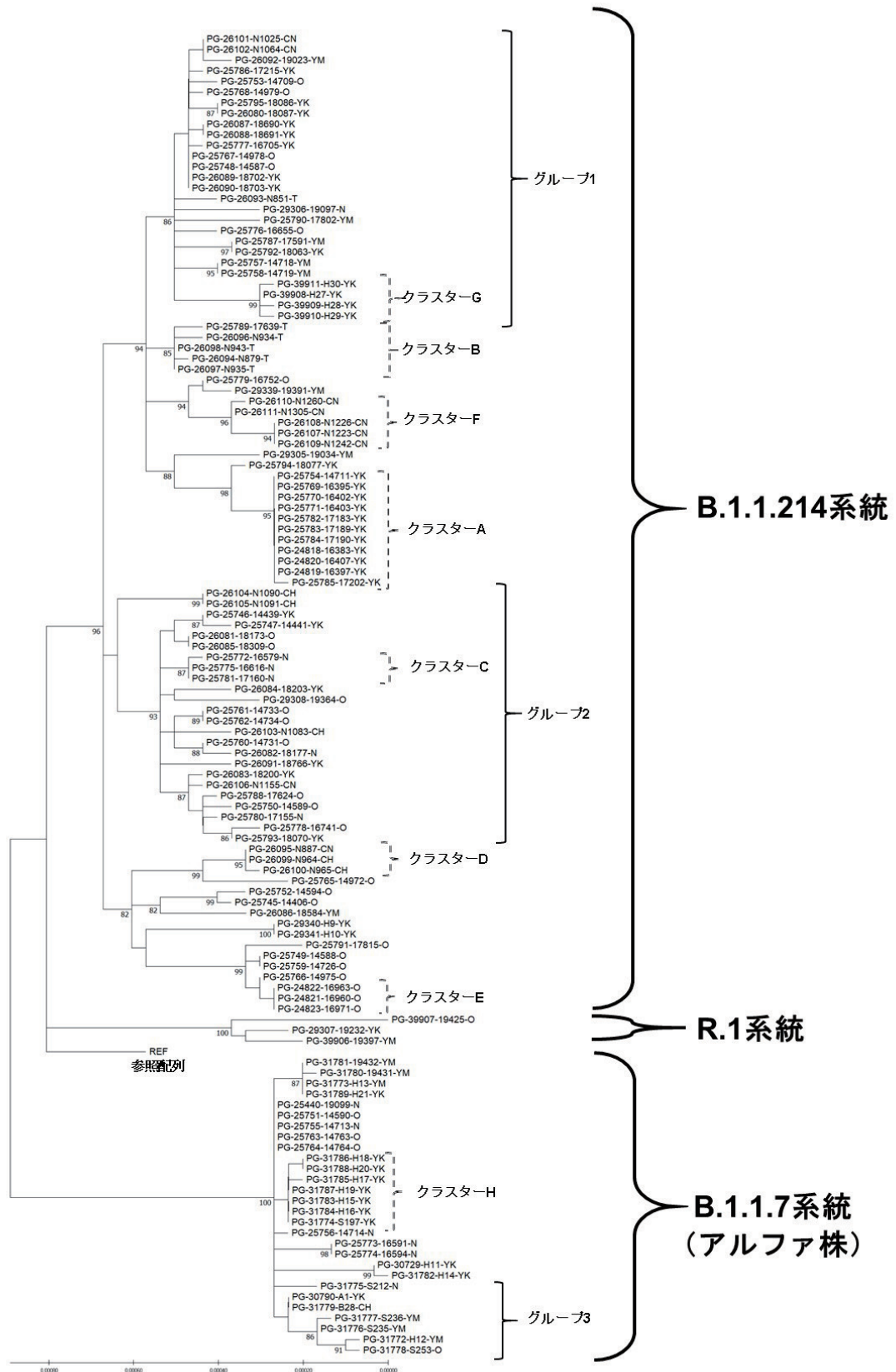


図8. 府内のSARS-CoV-2陽性株に係る系統樹 (2021年1月～3月)

- 5) Sekizuka T., Itokawa K., Hashino M., Okubo K., Ohnishi A., Goto K., Tsukagoshi H., Ehara H., Nomoto R., Ohnishi M., Kuroda M., Virus Diagnosis Group (NIID Toyama), COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP). 2021. A discernable increase in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 R.1 lineage carrying an E484K spike protein mutation in Japan. *Infect. Genet. Evol.*, 94, 105013.
- 6) Li Q., Wu J., Nie J., Zhang L., Hao H., Liu S., Zhao C., Zhang Q., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Zhang L., Li X., Huang W., Wang Y. 2020. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*, 182(5), 1284-1294.
- 7) Shirato K., Nao N., Katano H., Takayama I., Saito S., Kato F., Katoh H., Sakata M., Nakatsu Y., Mori Y., Kageyama T., Matsuyama S., Takeda M. 2020. Development of genetic diagnostic methods for detection for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. 2020. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 73(4), 304-307.
- 8) Leigh J.W., Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, 6(9), 1110-1116.
- 9) Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 38(7), 3022-3027.
- 10) Volz E., Mishra S., Chand M., Barrett J.C., Johnson R., Geidelberg L., Hinsley W.R., Laydon D.J., Dabrera G., O'Toole Á., Amato R., Ragonnet-Cronin M., Harrison I., Jackson B., Ariani C.V., Boyd O., Loman N.J., McCrone J.T., Gonçalves S., Jorgensen D., Myers R., Hill V., Jackson D.K., Gaythorpe K., Groves N., Sillitoe J., Kwiatkowski D.P., The COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium, Flaxman S., Ratmann O., Bhatt S., Hopkins S., Gandy A., Rambaut A., Ferguson N.M. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. medRxiv. in press.
- 11) Davies N.G., Jarvis C.I.; CMMID COVID-19 Working Group, Edmunds W.J., Jewell N.P., Diaz-Ordaz K., Keogh R.H. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. 2021. *Nature*, 593(7858), 270-274.