

長崎県環境保健研究センターにおける新型コロナウイルス検査の概要 (2019)

松本 文昭, 浦川 美穂, 小嶋 裕子
右田 雄二, 蔡 国喜, 高木 由美香, 増輪 文治, 田栗 利紹

Overview of Testing for SARS-CoV-2 in Nagasaki Prefectural Institute of Environment and Public Health (2019)

Fumiaki MATSUMOTO, Miho URAKAWA, Hiroko OJIMA
Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Yumika TAKAKI, Bunji MASUWA, Toshitsugu TAGURI

キーワード : SARS-CoV-2, 新型コロナウイルス感染症, 市中肺炎
Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Community-acquired pneumonia

はじめに

2019年12月に中国湖北省で発生したSARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) による新型コロナウイルス感染症 (Coronavirus disease of 2019: COVID-19) は、その後、世界各地に広がり、2020年6月26日時点で216の国と地域で感染者が確認されている¹⁾。COVID-19は、主に飛沫感染・接触感染を通じて広がり、1-14日間の潜伏期間を経て、発熱や呼吸器症状、全身倦怠感等で発症する²⁾。初期症状はインフルエンザや感冒と似ており、発症初期にこれらの疾患と区別するのは困難である³⁾ため、抗原検査や遺伝子検査による検査診断が重要となる。わが国における行政対応については、2020年1月16日より感染症法に基づく疑似症サーベイランスの枠組みで探知されることとなり、1月28日に指定感染症に指定された。このように時々刻々と状況が変化し情報が錯綜する中で、2020年2月から長崎県環境保健研究センターにおいてCOVID-19疑い患者に対する検査態勢を整備し検査を実施してきた。

ここでは、短い期間とはいえ、今後の診断および検査態勢整備への寄与を目的として2019年度中に実施したCOVID-19検査結果とともに、患者等情報から得られた疫学情報をまとめたので報告する。

材料および方法

1 供試した検体の類型

2020年2月14日から3月31日までに、長崎県内でCOVID-19を疑われた者のうち、保健所が行政検査

を依頼したものを対象とした。管轄する保健所等の職員が各医療機関において採取された検体を受領し、主治医が記載した臨床症状等の検査票を付して当センターに搬入した。

調査期間中に長崎県においてCOVID-19が疑われたもののうち、患者221名、無症状者13名、感染疑いの死者2名の併せて236名が探知され、それらの者から採取された上気道検体249検体および下気道検体129検体の延べ378検体が搬入された。

2 検体検査 (図1)

(1) 検体前処理

採取検体のうち鼻咽頭拭い液等の上気道由来検体は、10秒間ボルテックスした後の懸濁液を2.0 mL スクリューキャップチューブに移し、12,000 rpm, 15 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140 μ LをRNA抽出に供した。

喀痰検体は、1~3倍量の滅菌済PBS (-) を添加後、ボルテックスにより懸濁させ、2.0 mLスクリューキャップチューブに移した後、15,000 rpm, 30 min.の条件で遠心処理を行い、細胞成分を除去した上清140 μ LをRNA抽出に供した。

(2) RNA抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて、添付文書に基づき精製操作を行い、キットに同梱されているBuffer AVEにより溶出した60 μ LのRNA抽出液をPCR検査に供した。

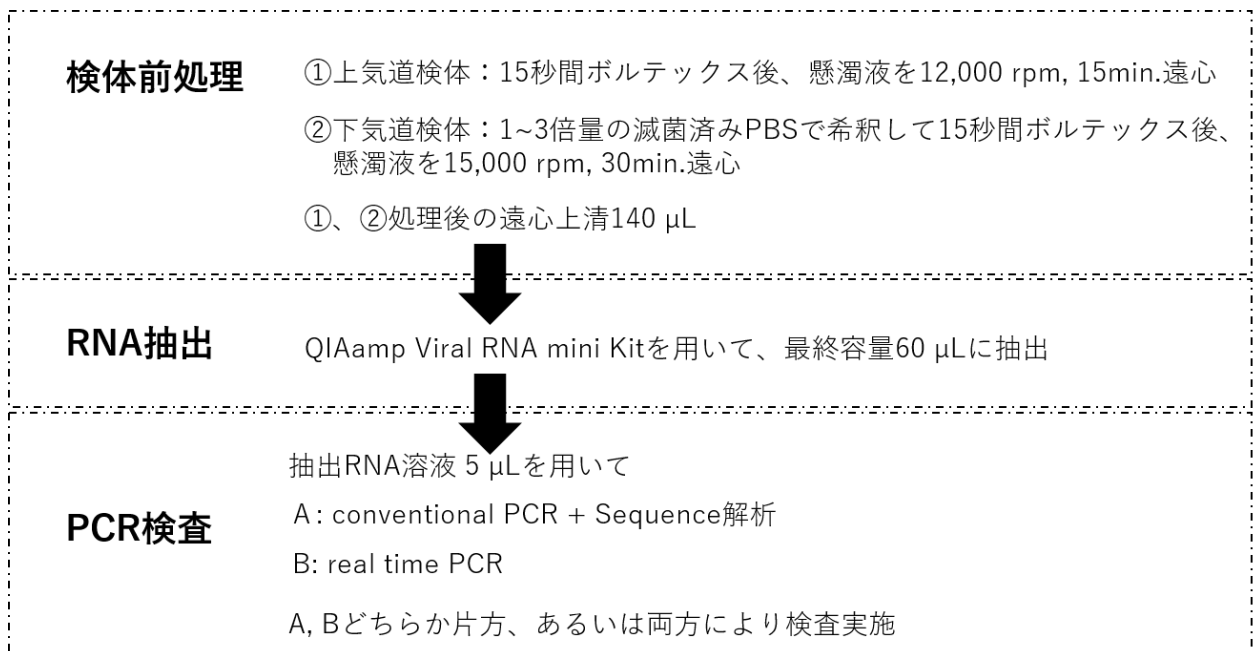


図1. COVID-19にかかる検査フロー

(3) PCR検査

新型コロナウイルス検出マニュアル⁴⁾に記載されたプライマーおよびプローブを用いて、conventional PCRとreal time PCRをどちらか一方または両方実施した。PCR試薬は、conventional PCRにおいては、One step RT-PCR kit (QIAGEN) およびEx Taq Hot Start version (TaKaRa) を用いて反応を行い、real time PCRにおいては、QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN) または、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher) を用いて反応を行った。real time PCRでは、40サイクル以内に増幅曲線の立ち上がりを確認できた検体を陽性と判定した。conventional PCRで特異的増幅産物が得られた場合、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて増幅産物を精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) によりサイクルシーケンス反応を行い、Gel Filtration Cartridge (EdgeBioSystems) により余剰のBig Dyeを除去したのち、ABI3500 Genetic Analyzerで解析し塩基配列を決定した。決定した配列はBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いた相同性検索により増幅産物の配列がSARS-CoV-2のものと確認できたものを陽性と判定した。

3 疫学解析

(1) 患者情報の統計解析

今回搬入されたCOVID19疑い患者等検体の特

徴を明らかにするために、主治医から提出された検査票に基づいて年齢、性別および臨床症状を抽出・編集した後に、統計ソフト SPSS (Statistical Package for Social Science, IBM SPSS Statistics 20) により SPSS データセットを作成し統計解析に供した。

(2) 統計解析法

解析は、再検査者、陰性確認検査を除いた検査対象者236人のデータに基づき、年齢中央値、臨床症状の性別による差を検討した。統計解析手法に関しては、連続変量 (平均年齢の差等) に対して Student's t-test、カテゴリ変量間に割合の比較に際しては Pearson Chi-Square検定を採用した。

結果

調査期間中にCOVID-19疑い患者等236名から採取された上下部気道検体378検体が搬入された。PCR検査の結果、4名分5検体よりSARS-CoV-2の遺伝子が検出された。検査態勢整備当初は検査精度を確認するために陽性例のうち初発例および2例目は、real time PCRに加えてconventional PCRおよびシーケンス解析を併用して判定した。十分な検査の信頼性が確認された3例目以降はreal time PCRのみで判定した。陽性者の類型は、無症状病原体保有者が1名、症状を有する患者が3名であった。

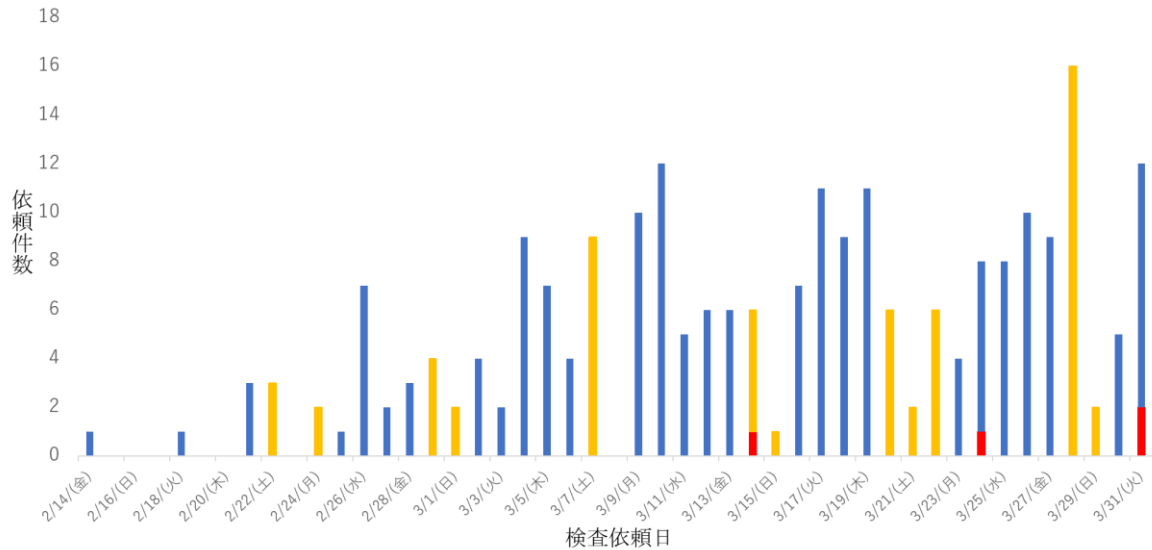


図2. 検査依頼日別のCOVID-19検査件数

*黄の縦棒は休日・祝日の検査を表す。

**赤の縦棒は陽性者を表す。ただし3/31の陽性者は4/1の検査で判明したもの

表1. 長崎県におけるCOVID-19疑い患者の疫学情報 (n=236)

	総数 (n=236)	男性, (n=130)	女性, (n=106)	p value
性別, n (%)	236	130 (55.1)	106 (44.9)	
年齢中央値 (IQR)	52 (32-72)	56 (35-76)	43 (27-68)	0.020
臨床症状				
発熱 (≥ 37.5), n (%)	169	92 (54.4)	77 (45.6)	0.751
上気道炎, n (%)	68	37 (54.4)	31 (45.6)	0.895
下気道炎, n (%)	108	64 (59.3)	44 (40.7)	0.236
その他の呼吸器症状, n (%)	39	17 (43.6)	22 (56.4)	0.114
胃腸炎, n (%)	23	11 (47.8)	12 (52.2)	0.461
その他の症状, n (%)	88	44 (50.0)	44 (50.0)	0.226
基礎疾患あり, n (%)	108	62 (57.4)	46 (42.6)	0.510

検体搬入日に基づく調査期間中のCOVID-19検査件数の推移を図2に示す。長崎県におけるCOVID-19にかかる依頼検査は2月14日から検体の搬入が始まり、ほぼ途切れることなく3月31日まで検査依頼が続き、最も多い日で16件の検査依頼があった。期間を通した1日あたりの平均依頼数は5.9件であった。調査期間中、検査依頼数は漸増傾向がみられた。

今回調査したCOVID-19疑い患者等の疫学情報を表1に示す。性別の内訳は男性130名女性106名で若干男性が多かった。男性の年齢中央値は52歳、女性の年齢中央値は43歳であり、疑い患者の年齢は男性が有意に高かった (p value=0.05)。症状のうち最も多かったのは発熱 (169名, 71.6%) で、次いで下気道炎 (108名, 45.8%) であった。疑い患者の半数近くが基礎疾患を有していたが、いずれの症状も性別による有意差はみられなかった。

考 察

長崎県における2019年度中のSARS-CoV-2陽性者は、COVID-19疑い患者236名中4名であり、検査依頼数に占める陽性率は1.7%であった。この数値は、2020年6月27日時点における日本国内のCOVID-19検査陽性率4.8%⁵⁾よりも低く、長崎県は国内の他地域に比べるとSARS-CoV-2の浸淫が小規模だったことが示唆された。

COVID-19疑い患者等の疫学情報については、調査数が限定されており、未だ明確な結論は得られていない。今後データベースを充実させるとともに国や世界のデータとの比較を念頭に置いて解析を進めたいと考えている。

COVID-19は、他の呼吸器感染症と鑑別可能な特異的な症状はないため臨床症状から他の病原体による市中肺炎等と区別することは困難なことが知られている⁶⁾。今回の調査結果においてもCOVID-19疑い患者等の性別および臨床症状に特徴的な傾向が認められることはなく(表1)、これらの患者から採取された検体の大半からはSARS-CoV-2は検出されなかった。しかし、これらの検体について、COVID-19と鑑別が困難な他の呼吸器ウイルス等の検索は行われていない。他県のCOVID-19検査事例においては、ヒトメタニューモウイルスが検出された事例⁷⁾が報告されていることから、他の呼吸器病原体の検査態勢を整え強化することも、本感染症の効率的な診断や正確な浸淫状況の把握のために重要である

と考えられた。

謝 辞

COVID-19疑い例調査にご協力頂いた各医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました佐世保市、県立各保健所並びに各振興局等の関係諸氏に深謝する。

参 考 文 献

- 1) World Health Organization: Coronavirus disease (COVID-19) pandemic, <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (2020.6.27)
- 2) 国立感染症研究所 感染症疫学センター: 〈注目すべき感染症〉新型コロナウイルス感染症 (COVID-19), IDWR 2020年第23号
- 3) 令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業 一類感染症の患者等の発生に備えた臨床的対応に関する研究班: 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の診療の手引き 第2.1版, p6
- 4) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>
- 5) 厚生労働省: 新型コロナウイルス感染症について 国内における都道府県別PCR検査陽性者数 (2020年6月28日掲載分), https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000164708_00001.html (2020年6月28日)
- 6) 日本環境感染学会: 医療機関における新型コロナウイルス感染症への対応ガイド 第3版 p2
- 7) 上田紗織ら: COVID-19感染症検査陰性検体の病原体検索—福岡県—, IASR Vol. 41 pp8 4-85: 2020年5月号