

研究報告編

報 文

長崎県における熱中症発生と気象との関連性 (2020-2022 年度)

横田 哲朗, 古賀 康裕, 福田 祥一

気候変動の影響の中でも熱中症による健康影響については、長崎県内でも死亡者が出ており対応は急務である。そこで、熱中症の地域特性を把握するため、気象庁観測地点よりも細かい地域ごとに、2020 年から 2022 年までの 3 年計画で気温および湿度を測定できるデータロガーにより気象観測を実施した。3 年間観測した気象データより熱中症発生リスクの指標となる暑さ指数 (WBGT: Wet-bulb globe temperature) (以下「WBGT」という。) を推計したが、WBGT が高い地域が必ずしも熱中症による救急搬送者が多いわけではないことが判明した。この要因として、高齢者は熱中症の発症リスクが高いため、高齢者の割合が多い地域において、熱中症による救急搬送者が多い傾向にあることと、WBGT が高い地域では暑熱順化が比較的進みやすいため、WBGT が低い地域と比べると熱中症の発症が抑えられている可能性が示唆された。しかし、特に WBGT が高い傾向を示した島原地域では他の地域と比較して熱中症による救急搬送者の症状程度が重くなる傾向にあることが判明したところであり、特に注意すべき地域であることが示された。2021 年からは WBGT が 31 以上になると予想される日に、国が熱中症警戒アラートを発出しており、また、令和 5 年 2 月には既存のアラートの一段上の熱中症特別警戒アラートが創設されることが盛り込まれた気候変動適応法の改正案が閣議決定されている。長崎県においても、熱中症の発生を抑えるために効果的な普及啓発手法について検討していく必要がある。

キーワード: 熱中症、暑さ指数 (WBGT)、気象データ

はじめに

世界の年平均気温は 100 年あたり 0.73°C の割合で、日本の年平均気温は 100 年あたり 1.28°C の割合でそれぞれ上昇している¹⁾。世界中で温室効果ガスの排出を抑制する対策 (緩和策) に取り組んでいるが、最も厳しい温暖化対策を取ったとしても、世界の平均気温は上昇し、21 世紀末に向けて気候変動の影響のリスクが高くなると予想されている。このようなことから、緩和策を講じて回避できない気候変動の影響を予防・軽減するための対策 (適応策) の必要性が世界的に強調されている。

長崎市 (長崎地方気象台) においても年平均気温が 100 年あたり 1.50°C の割合で上昇しており²⁾、長崎県では、「第 2 次長崎県地球温暖化 (気候変動) 対策実行計画」を策定し、必要な取組を推進中である。環境保健分野では、自然生態系、健康影響などの分野で、より地域の実情に応じた対応が望まれているが、健康影響のうち特に熱中症に関しては、死亡者も出ており対応は急務であると考えられる。ここ 10 年の熱中症による救急搬送者数の推移を図 1 に示す。

熱中症の危険性は県内一様ではなく気象条件等による地域ごとの特性があるものと考えられるが、気象庁による長崎県内の観測地点は、気温が 18 地点 (本土

10 地点、離島 8 地点)、湿度が 6 地点 (本土 4 地点、離島 2 地点) であり、このうち環境省により WBGT が公表されている地点は 14 地点である。熱中症発生の地域特性の分析には、より地域に密着した気象観測を実施する必要があると考えられるため、2020 年から 2022 年までの 3 年計画で、気温および湿度を測定できるデータロガーを用いた気象観測を実施した。

本稿では、2020 年から 2022 年にかけて実施した気象観測結果および熱中症発生状況、それらの関連性について報告する。

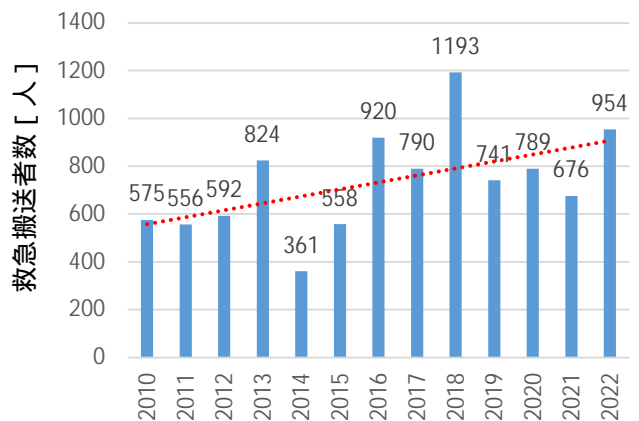


図 1 長崎県における熱中症による救急搬送者数

調査地点および方法

1 気象(気温および湿度)の観測

図 2 に示す各観測地点において、データロガーを用い気温および湿度を観測した。各観測地点は小学校であり、各校が所有している百葉箱もしくは当センター所有の小型百葉箱を設置し、その中にデータロガーを設置した。データロガーの設置状況を図 4 に示す。基本的に各地点 3 か年継続して調査を行っているが、一部の地点は令和 3 年度から追加(五島市: 福江小学

校、新上五島町: 有川小学校、対馬市: 鶏鳴小学校) している他、百葉箱の劣化等により別の小学校に地点を変更したケース(諫早市: 真津山小学校は 2021 年度より観測開始)がある。

- ・観測機器: おんどり RTR-507S, RTR-507B (株ティアンドデイ)
- ・地点数: 県内 40 地点
- ・観測年: 2020 年-2022 年
- ・観測月: 7 月 ~ 10 月

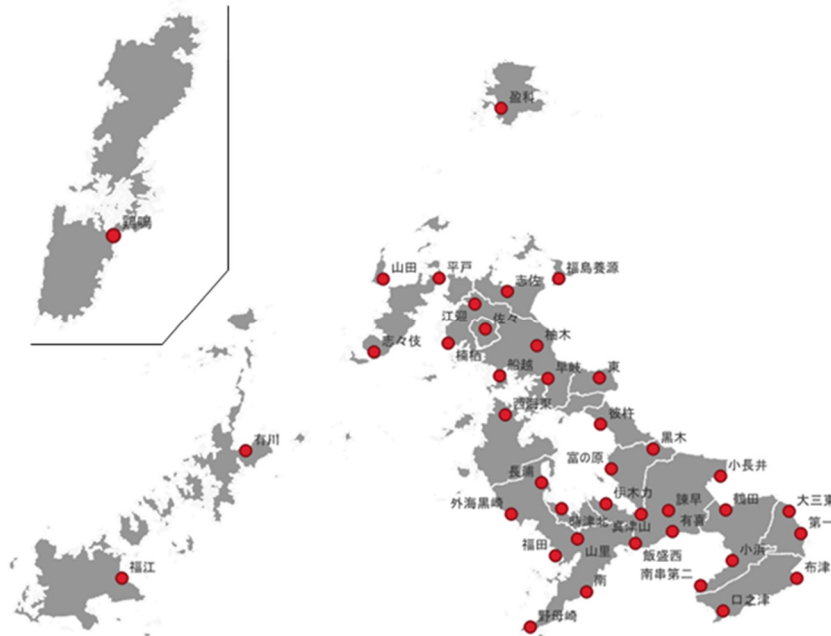


図 2 データロガーによる気象観測地点(図中の標記は小学校名)

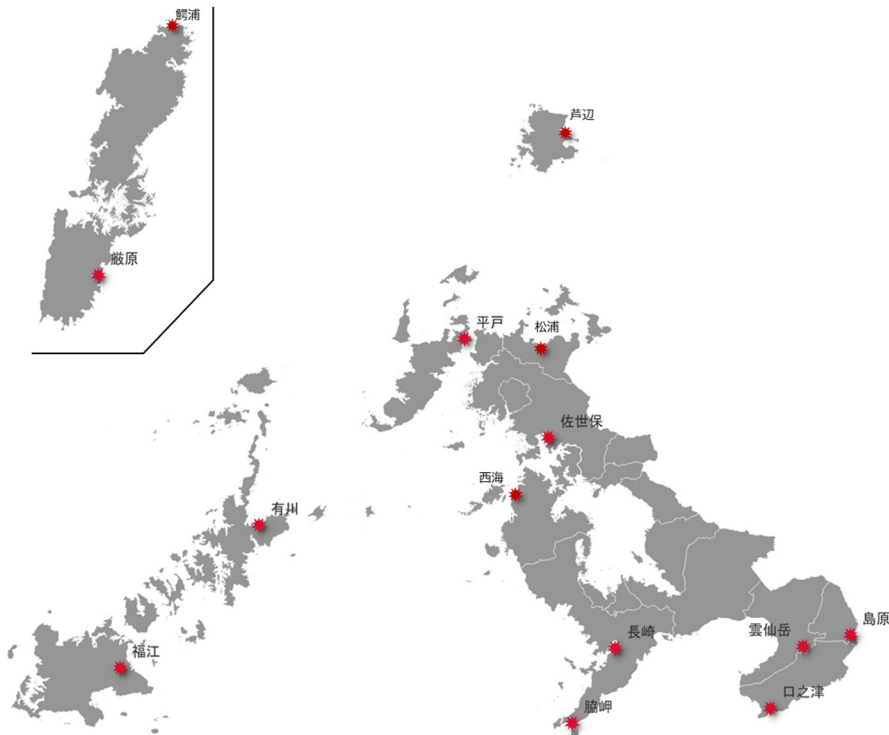


図 3 環境省による WBGT の公表地点(図中の標記は気象庁観測地点名)



図4 データロガーの設置状況

2 WBGT の推計

気温および湿度を観測した 40 地点について、以下の式³⁾を用いて WBGT の推定値を計算した。

$$\begin{aligned} \text{WBGT} = & 0.735 \times \text{Ta} + 0.0374 \times \text{RH} + 0.00292 \times \text{Ta} \\ & \times \text{RH} + 7.619 \times \text{SR} - 4.557 \times \text{SR}^2 - 0.0572 \\ & \times \text{WS} - 4.064 \end{aligned}$$

Ta: 気温 (°C)、RH: 相対湿度 (%),
SR: 全天日射量 (kW/m³)、WS: 風速 (m/s)

観測した気温および湿度に加え、直近の気象庁観測地点における風速および全天日射量を用いた。直近の気象庁観測地点で全天日射量の観測が無い場合は、以下の式⁴⁾を用いて日照時間から全天日射量の推定値を計算した。

$$\text{SR}/\text{SR}_0 = 0.198 + 0.537 (n/N)$$

SR₀: 大気外水平面日射量 (kW/m³)、
n: 日照時間 (hour)、N: 可照時間 (hour)

3 熱中症発生状況の確認

熱中症の発生状況については、県消防保安室がとりまとめている熱中症による救急搬送者数に加え、県内 10 消防局・消防本部から提供を受けた熱中症による救急搬送者の詳細データを用いた。

結果及び考察

1 WBGT の推計値に基づく地域の暑熱環境

始めに、熱中症発生の地域特性を把握するために注意すべき点として解析に用いたデータ数が挙げられる。仮に、市町単位では人口にかなりの差が

生じることから、解析は消防局又は消防本部管轄区域単位とし、さらに一部地域を統合することで、県内を 7 地域に区分した。これにより、全ての地域が地方自治法に基づく「市」の要件である人口 5 万人を超えた。7 地域の区分について、図 5 及び表 1 に示す。以降の解析はこの 7 地域を基本単位として行った。

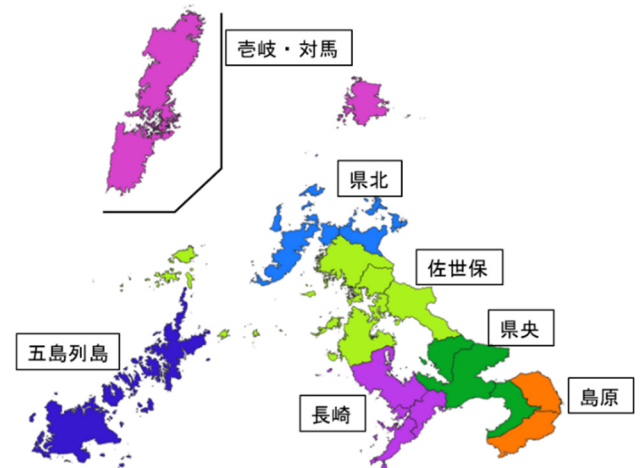


図5 解析した地域単位 (7 地域)

表 1 解析地域 (7 地域) の内訳

地区名	管轄する消防局 (本部)	地区内の市町
長崎	長崎市消防局	長崎市、長与町、時津町
佐世保	佐世保市消防局	佐世保市、西海市、川棚町、東彼杵町、波佐見町、佐々町、小値賀町
県中央	県中央地域広域市町村圏組合消防本部	大村市、諫早市、雲仙市 (一部を除く)
県北	平戸市消防本部、松浦市消防本部	平戸市、松浦市
島原	島原地域広域市町村圏組合消防本部	島原市、南島原市、雲仙市の一部
五島列島	五島市消防本部、新上五島町消防本部	五島市、新上五島町
壱岐・対馬	壱岐市消防本部、対馬市消防本部	壱岐市、対馬市

WBGT は熱中症発生リスクの指標となり、WBGT の値が 31 以上は熱中症発生のリスクが「危険」⁶⁾とされ特に注意が必要となる。地域の暑熱環境の特徴を探るために、WBGT 31 を基準として各地域の日最高値が 31 以上となった頻度について解析を行った。気象観測を行った地点の 2020-2022 年:7 月-10 月の間に WBGT 日最高値が 31 以上となった日の出現頻度を算出した。これを 7 地域ごとに平均したものを図 6 に示す。本解析には気象庁観測点の WBGT 公表データも使用した。ただし、周辺より極端に標高が高い地点である雲仙岳のデータは最終的な地域平均値の過小評価に繋がることが予想されたため除外している。なお、データロガーのセンサー不具合により一部データを除外した地点があるほか、データロガーの設置時期の関係から 7 月の一か月分のデータが欠測している地点があるが、除外又は欠測した部分に同時期の他地点のデータ(除外又は欠測した地点周辺で WBGT 日最高値 31 以上の出現頻度が最も頻度が多い地点、少ない地点それぞれのデータ)を代入しても最終的な地域別の平均出現率にほとんど影響しなかったため、そのまま解析を進めた。解析の結果、島原地域の WBGT 日最高値 31 以上の出現頻度が特に多く、同地域は県内でも暑熱環境が厳しいことが判明した。一方、壱岐・対馬地域では最も少なかった。

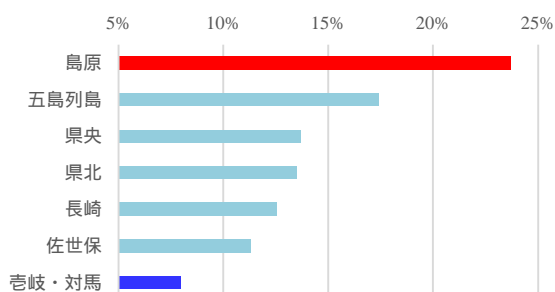


図 6 WBGT 日最高値 31°C 以上の出現頻度 (2020-2022 年:7-10 月)

4 熱中症発生状況

2020-2022 年の熱中症救急搬送者数は 2,419 人であり、この 3 年間では 2022 年が最も多かった。3 年間の熱中症救急搬送者数について、表 2 に示す。

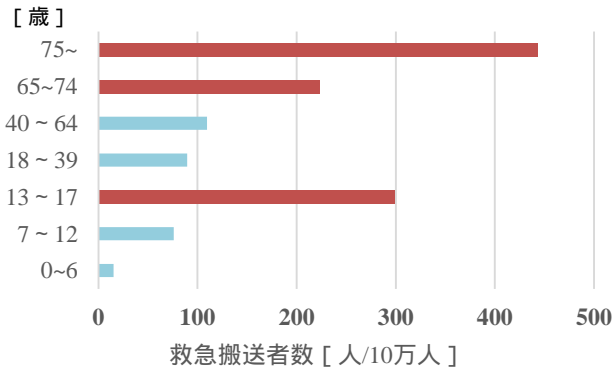
表 2 2020-2022 年の熱中症救急搬送者数(人)

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	合計
2020年			79	116	515	79		789
2021年		25	88	272	237	54		676
2022年	2	21	129	425	308	63	6	954

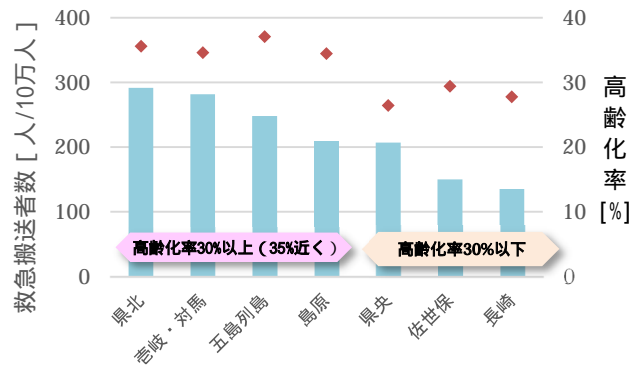
このうち、発生場所が不明の事例や、発生場所が海上といった特殊な事例を除いた 2,399 人分のデータを用いて、年代、地域、高齢化率、発生場所等について解析を行った(図 7)。図 7 (a) は人口 10 万人あたりの年代別救急搬送者数を示す。基本的に年齢に比例して熱中症による救急搬送者数は増える傾向にあるが、中高生世代(13-17 歳)では特異的に増加していた。図 7 (b) は地域別の高齢化率と人口 10 万人当たりの救急搬送者数を示す。高齢化率が高い地域ほど、救急搬送者が多くなる傾向が見られた。また、図 7 (c) は、年代別の発生場所を示しており、発生場所の詳細については消防庁の分類による。救急搬送者数が多い 65 歳以上の世代では、半数以上が住居での発生となっていた。年代特異的に救急搬送者数が多くなっていた中高生世代では、教育機関と公衆(屋外)での発生が約 7 割を占めているが、この要因として部活動等の課外活動の影響があると推測される。

図 6 で示したとおり、島原地域は高温となりやすい地域であるため、熱中症の発生リスクは高い地域であると予想していたが、図 7 (b) に示すとおり、単位人口あたりの熱中症救急搬送者数は多いわけではなく、むしろ高齢化率の高さを考えると少ないと考えられる。逆に、高温の発生頻度が少なかった壱岐・対馬地域は島原地域と逆の傾向を示した。この要因として、地域により暑熱順化の進行に差があることが考えられる⁷⁾ 他、高温になりやすい地域では住民が何等かの暑熱耐性を獲得していることが考えられる。一方、熱中症による救急搬送後の初診時の診断結果では、島原地域は要入院となる割合が他の地域よりも多く、熱中症による死亡者数を減少させることを考えた場合には、注意すべき地域であることが判明した。地域ごとの初診時の症状程度について図 8 に示す。初診時の診断により軽症と判断された場合は入院の必要はなく、中等症及び重症と診断された場合は要入院となる。また、重症は 3 週間以上の入院であり中等症は重症以外の期間の入院である。本稿では、中等症以上を基準に解析したところ、県内全体では中等症以上の割合が約 44%であるのに対し、島原地域は 58.3%と地域間で最も多い結果となった。対象的に、壱岐・対馬地域では中等症以上の割合が 25.5%と最も少なかった。なお、図 7 において死亡はないが、これは初診時の診断に基づくものであることに起因する。厚生労働省公表のデータによれば、熱中症を原因とした死亡者は、2020 年及び 2021 年にそれぞれ 17 人と 10 人発生している(2022 年の a データは本稿執筆時点で未公表⁸⁾)。

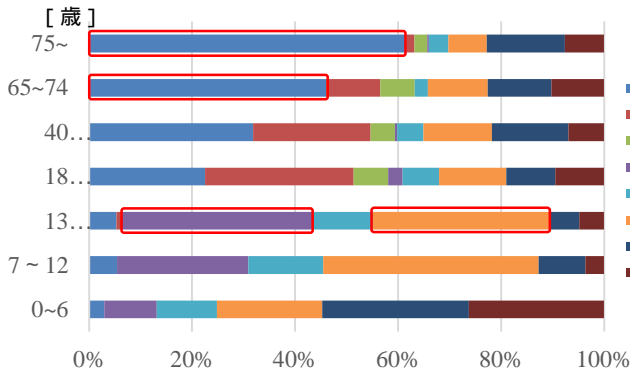
(a) 年齢別の救急搬送者数



(b) 地域別の高齢化率と救急搬送者数



(c) 年齢別の発生場所の種類と割合



- 住居 : 敷地内の全ての場所を含む。
- 仕事場 : 道路工事現場、工場、作業所等。
- 仕事場 : 田畑、森林、海、川等。農・畜・水産業を行っている場合のみ。
- 教育機関 : 幼稚園、保育園、小・中・高等学校、専門学校、大学等。
- 公衆(屋内) : 不特定者が出入りする場所の屋内部分。
劇場、コンサート会場、飲食店、百貨店、病院、公衆浴場、
駅(地下ホーム)等
- 公衆(屋外) : 不特定者が出入りする場所の屋外部分。
競技場、各対象物の屋外駐車場、野外コンサート会場、
駅(屋外ホーム)等
- 道路 : 一般道路、歩道、有料道路、高速道路等
- その他 : 上記に該当しない場所

図7 熱中症救急搬送者数に関する解析結果 (2020-2022年)

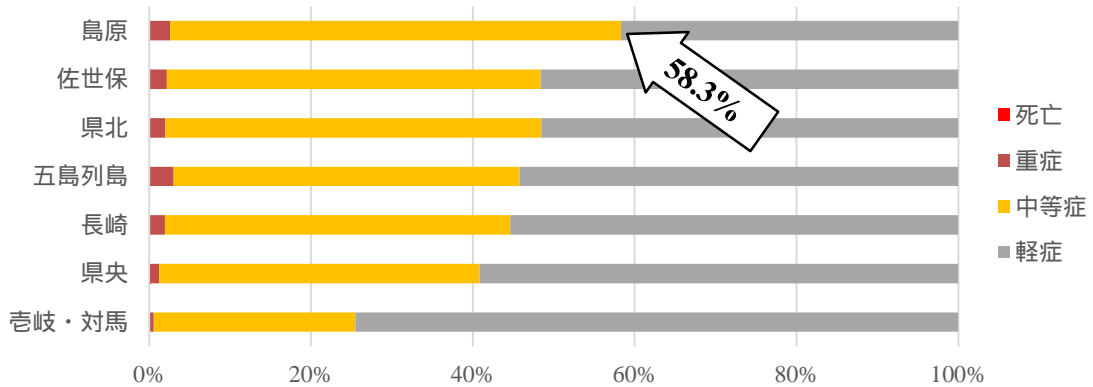


図8 各地域の初診時の症状程度の割合

5 WBGTと熱中症発生状況との関係

基本的に WBGT が高くなると熱中症救急搬送者数も増加するが、暑熱順化の進行に地域差があることが示唆されたことから、WBGT 日最高値(地点内の平均値)と、熱中症による救急搬送者数について解析を行った。救急搬送者の個別事例ごとに、その日の日最高 WBGT を求め、一定の WBGT ごと(0.2 刻み)に振り分けを行った。その搬送者数を、

振り分けた WBGT の日数で割り1日当たりの搬送者数とした。最後に、人口 10 万人あたりの搬送者数に換算した。以上のデータを表にプロットし指数関数近似を行った。また、本解析においては独自に行った気象データの観測期間の関係上、7 月から 10 月までを対象期間としたため、熱中症救急搬送者に関するデータも7月から10月分のみを解析対象(2,070 人分)とした。

解析の結果、図 9 のとおり各地域を 3 タイプに分類した。一つ目は人口が多い地域（長崎、佐世保、県央）で見られたタイプであり、図 9(a) に代表として長崎地域のグラフを示す。県全体の結果と比較すると低 WBGT 域から高 WBGT 域の全ての段階で県全体のグラフを下回っていた。この要因として、このタイプを示した地域は熱中症弱者である高齢者の人口割合が県平均を下回っていることが考えられる。これに対し、高齢化率が高い地域（県北、壱岐・対馬）で見られたタイプ（代表地域：県北）である図 9(b) では、低 WBGT 域から高 WBGT 域の全ての段階で県全体のグラフを上回っていた。比較的低い WBGT でも一定数の熱中症救急搬送者数があることが要

因であり、高齢化率が関係していると考えられる。最後に、前述のどちらとも異なるタイプを示した地域（島原、五島列島）を、島原地域を代表として図 9(c) に示す。低 WBGT 域では県全体を上回っており、これは県北地域と同様に高齢化率の高さが関係していると考えられる。特徴的なのは高 WBGT 域であり、こちらは県全体を下回る結果となった。高 WBGT 域における熱中症救急搬送者数の増加率が低い要因の詳細は不明であるが、このタイプを示した地域の共通点としては、県内でも暑い地域（図 6）であることが挙げられ、前述のとおり住民の暑熱順化が進みやすいことや何らかの暑熱耐性を獲得していることが要因の一つと考えられる。

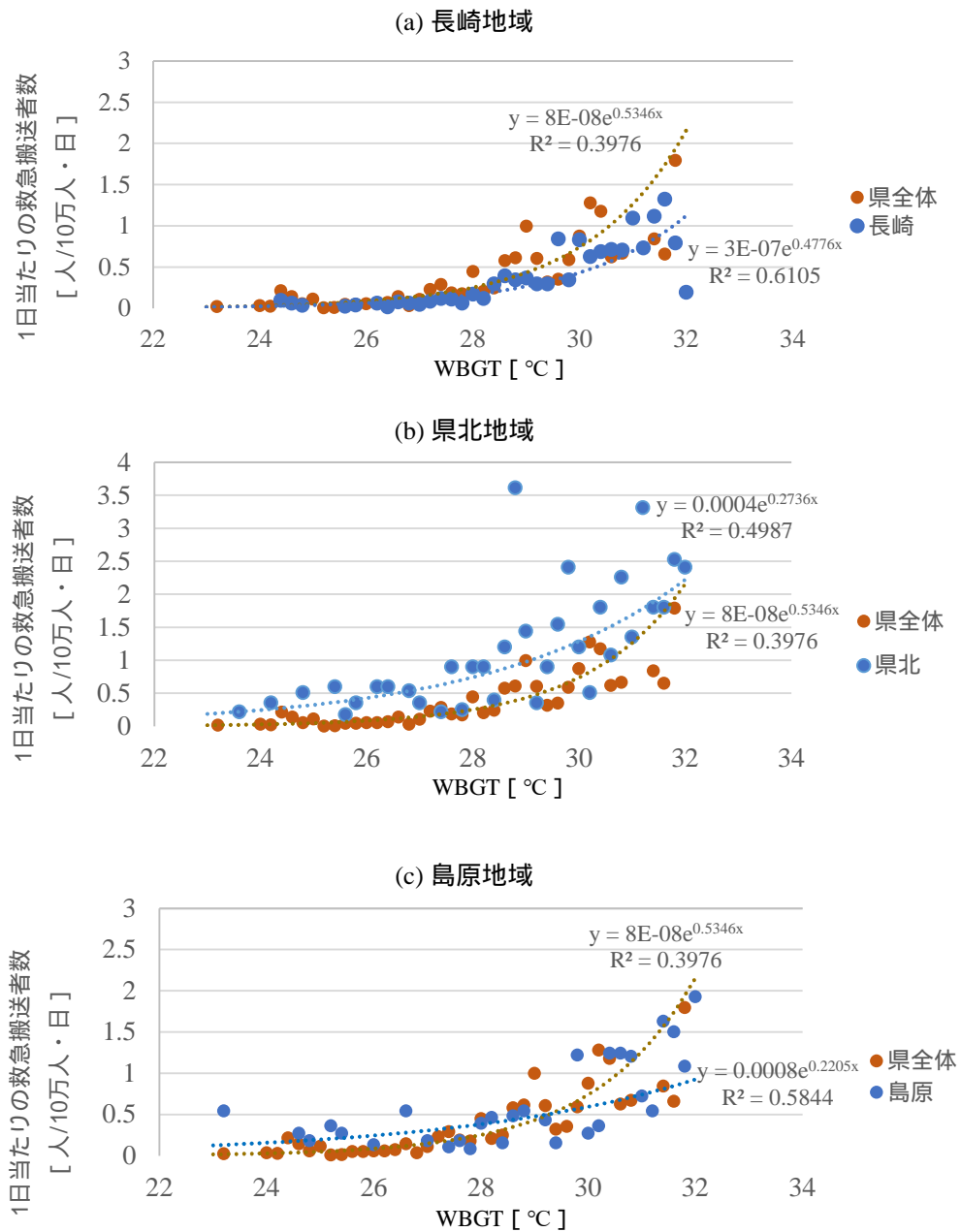


図 9 WBGT ごとの1日あたりの救急搬送者数

図 8 (c) に示したとおり、高 WBGT 域において熱中症救急搬送者数が増加しにくい地域があり、特に島原地域ではこの傾向が顕著であった。高 WBGT 域の搬送者数が少ない要因として住民の暑熱順化が進みやすいことやなんらかの暑熱耐性を獲得していることなどが考えられるが、基本的に暑熱に対する弱者である高齢者についても同様に高 WBGT 域でも救急搬送者数が増加しにくいのか確認を行った。図 10 (a) に島原地域の 65 歳以上と 65 歳未満のそれぞれについて、図 9

と同様の解析を行った結果を示す。対照として図 9 (b) に県全体の解析結果を示す。この結果、島原地域の 65 歳以上において高 WBGT 域での救急搬送者数の伸びが緩やかであることが窺え、他の地域と比較して明確な差があるとまでは言えなかったが、65 歳未満の場合は、高 WBGT 域での救急搬送者数の立ち上がりがほとんど見られず特徴的であった。なお、本解析に用いた熱中症救急搬送者数は地域間でデータ数に差がある点について留意する必要がある。

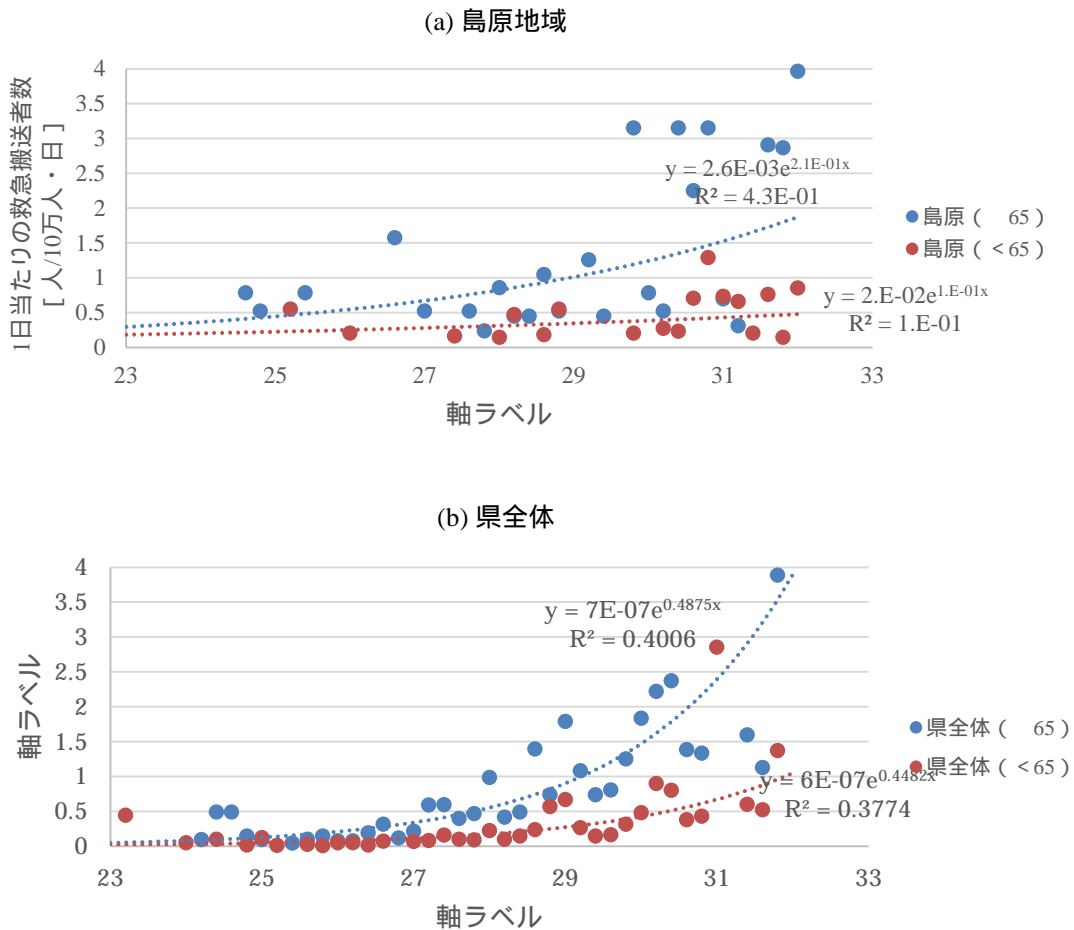


図 10 年齢別の WBGT ごとの 1 日あたりの救急搬送者数

6 局地的な熱中症発生状況の解析

これまでの解析では、消防局 (消防本部) 管轄地域ごとに解析を行ってきたが、より局所的な地域特性を把握するために、小学校区単位での解析を試みた (離島地区を除く)。結論から言うと、解析地域の単位を細かくしたことで、熱中症救急搬送者のデータが分散し、3 年間のデータでは解析を行うにあたり十分ではないと判断するに至った。しかしながら、真津山小学校区においては、明らかに他の地域とは異なる特徴が出たため結果を示す。なお、各消防局 (消防本部) から提供を受けた発生所在地の情報において、消防局 (消

防本部) 内での取り纏めの最小単位が基本的に町単位としているケースがあったことや、使用した人口統計の都合から、一部の地域は小学校区単位でまとめることが困難であった。このような場合は町単位又は複数の小学校区をまとめて整理した。各小学校区の熱中症救急搬送者数の実数を示したものを図 10 に示す。作図には国土交通省が公表している国土数値情報を使用しているが、大村市と南島原市の小学校区については解析で情報が登録されておらず、小学校区ごとの図示が困難であり、また、市単位で熱中症救急搬送者数の実数を表示することが本図ではそぐわないこと

から灰色で示している（その他の灰色の地点は小学校区が無い地域（諫早湾干拓地、雲仙天草国立公園の一部等）である。なお、大村市及び南島原市の小学校区において、熱中症救急搬送者数が特筆して多かったものは無かった（両市の小学校区における熱中症救急搬送者数の最大人数：大村小学校区（大村市）_32名、西有家小学校区（南島原市）_18名）。また、各地域の熱中症救急搬送者数を人口10万人あたりに換算したものを図11に示す。図10及び図11から、真津山小学校区の熱中症救急搬送者数が、他の地域と比較し多いことが判明した。さらに、真津山小学校区における救急搬送者の年齢別内訳を確認したところ、52名中22名（42.3%）が13-17歳の中高生世代であり、発生場所は教育機関が7名、公衆（屋外）が10名、公衆（屋内）が3名、道路、住居がそれぞれ各1名であった。このことを念頭に真津山小学校区内に存在する教育機関等を確認したところ、複数の中学校・高等学校が集中している他、諫早市の屋外スポーツ施設が設置されていることを確認した。また、県央地域内の

気象観測地点（小学校）ごとのWBGT日最高値31以上の出現頻度を比較した（図12）。なお、真津山小学校での気象観測は2021-2022年の2か年であることから、比較したその他の観測地点（小学校）についても同様の期間で解析を実施した。その結果、真津山小学校における、WBGT日最高値31以上の出現率は19.5%であり、県央地域内では最も頻度が多く、高温になりやすい地域であることが示された。高温の要因は明らかではないが、真津山小学校区は埋立地が多く周辺よりも海拔が低いため、ある種盆地のような地形であることや、交通の要所であり交通網が発達していること、工業団地・住宅地が発達していること等が関係している可能性がある。真津山小学校区は比較的高温になりやすい環境であることと、部活動等の課外活動が活発な世代を擁する中・高等学校が集中していること、加えて屋外スポーツ施設が設置されている等の条件が重なり、中高生世代の熱中症救急搬送リスクが高くなっている可能性が示唆された。

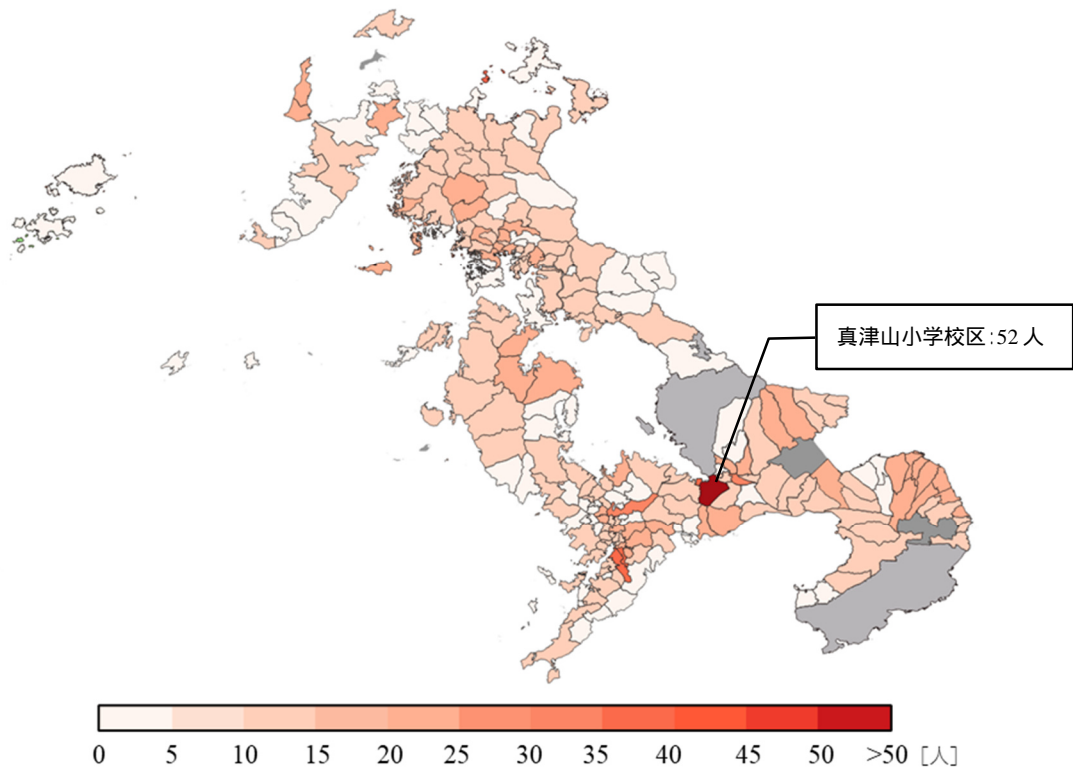


図11 小学校区ごとの熱中症救急搬送者の実数(2020-2022)

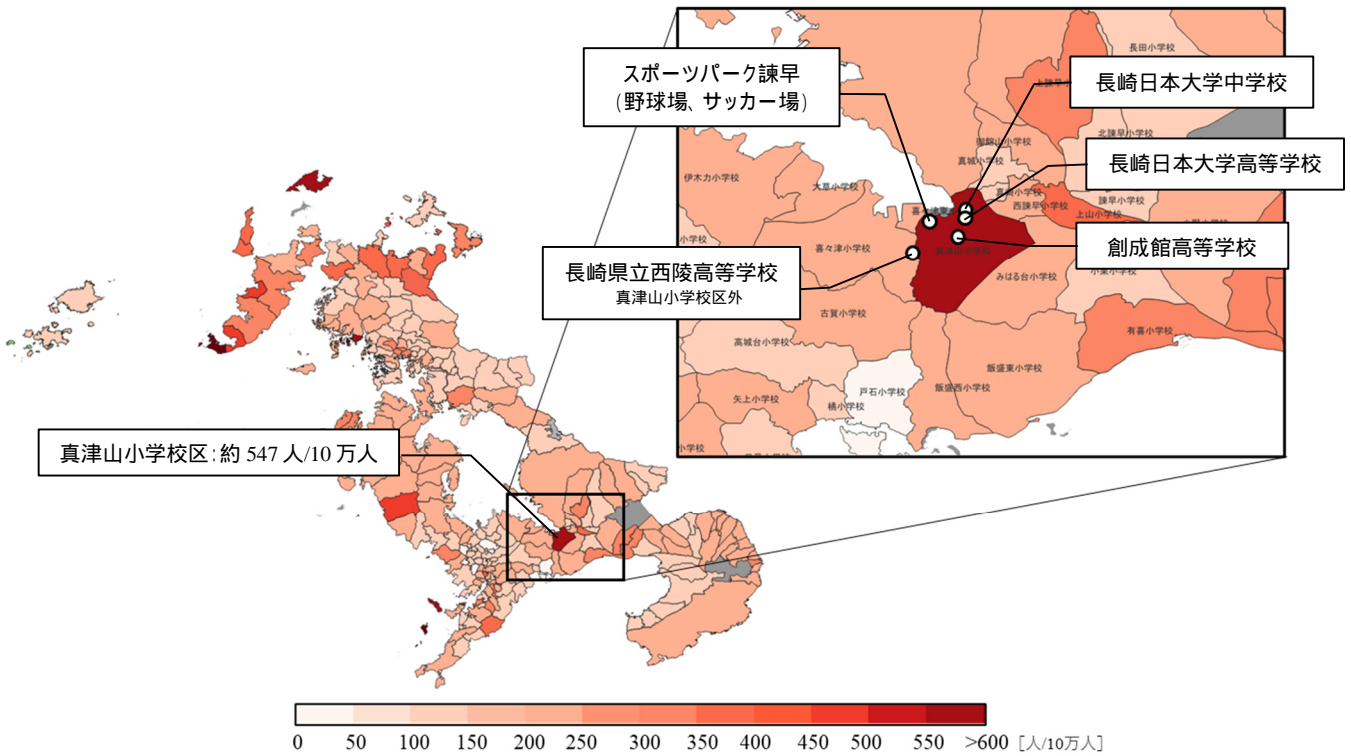


図 12 小学校区ごとの人口 10 万人当たりの熱中症救急搬送者数 (2020-2022)

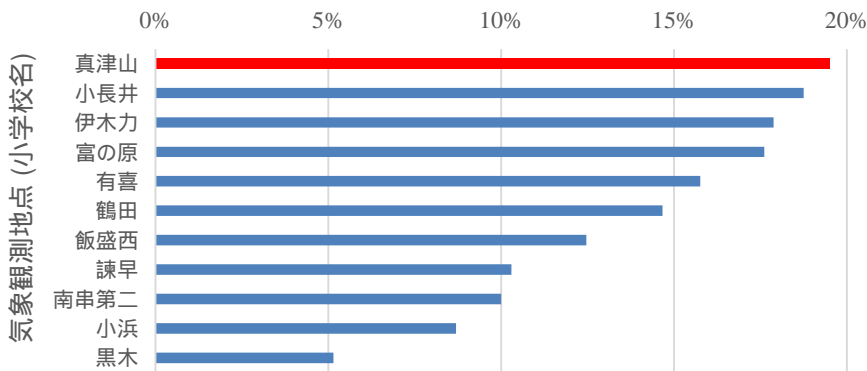


図 13 県央地域内の気象観測地点 (小学校) 別の WBGT_31°C以上の出現頻度 (2021-2022 年:7-10 月)

まとめ

2020-2022 年における県内各地点での WBGT の推計と熱中症による救急搬送者の状況調査を行った。得られた WBGT と県内の熱中症による救急搬送者数との関連性を確認したところ、WBGT が高くなるほど熱中症救急搬送者数は増加することを確認した。増加の傾向については、比較的低い WBGT から熱中症救急搬送者数が増加する地域や高い WBGT でも増えにくい地域など、地域ごとに特徴があることを確認した。また、地域の暑熱環境別では、比較的涼しい地域で熱中症救急搬送者数が多く、高温になりやすい地域では逆の傾向を示した。この要因として、地域ごとの高齢化率の違いや、暑熱環境に起因した暑熱順化の進行

程度が異なる等の要素が影響している可能性が考えられた。

熱中症による救急搬送者の初診時の症状程度に着目した場合にも地域ごとに差があることを確認した。症状程度については、高齢化率や本人体調、その時の行動等様々な要因が関係していると考えられる (症状程度に限らず熱中症全般に言える) が、少なくとも島原地域と壱岐・対馬地域を例に見ると、高温になりやすい地域ほど症状が重く、比較的涼しい地域ほど軽症で済む傾向にあることが示され、高温になりやすい地域では重点的に啓発を行う必要があると考えられる。

より狭い範囲での解析では、データ数の関係上思う

ような結果を得ることはできなかった。しかし、比較的高温となりやすい地域に多数の教育機関や屋外スポーツ施設が密集したことが要因と考えられる、中高生世代の熱中症救急搬送リスクが高い地域があることを確認した。

本調査により県内の熱中症発生の地域特性について知見を得ることができた。今後、得られた知見を活用した啓発活動等を関係機関と連携しながら効率的に実施していく予定である。

参考文献

- 1) 気象庁：気候変動監視レポート 2022, <https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/monitor/> (2022.7.11 アクセス)
- 2) 福岡管区気象台：九州・山口県の気候変動監視レポート 2021, <https://www.jma-net.go.jp/fukuoka/kaiyo/chikyu/report/report.html> (2022.7.11 アクセス)
- 3) 小野雅司, 登内道彦：通常観測気象要素を用いた WBGT (湿球黒球温度) の推定, 日本生気象学会雑誌, 50(4), 147-157(2014).
- 4) 紙井泰典, 藤本武志, 近森邦英：日射量の気候学的推定について, 高知大学学術研究報告 自然科学編, 50, 81-94(2001).
- 5) 環境省：平成 16 年度ヒートアイランド現象による環境影響に関する調査検討業務報告書, <https://www.env.go.jp/press/6226.html> (2022.7.7 アクセス)
- 6) 日本生気象学会：「日常生活における熱中症予防指針」Ver.4, <https://seikishou.jp/committee/> (2023.8.29 アクセス)
- 7) Antonio Gasparini et al 2016 Am. J. Epidemio. 183(11), 1027-1036.
- 8) 厚生労働省：「熱中症による死亡者数 人口動態統計(確定数)より」, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/tokusyu/necchusho20/index.html> (2023.8.29 アクセス)

Correlation between heatstroke incidence and meteorological factors in Nagasaki Prefecture (2020–2022)

Tetsuro Yokota, Yasuhiro KOGA, Shoichi FUKUDA

Given the heatstroke deaths in Nagasaki Prefecture, there is an urgent need to address the health impacts of this condition, considering the effects of climate change. To investigate the regional variations in heatstroke, meteorological observations were performed using data loggers capable of measuring temperature and humidity more compressively than the Japan Meteorological Agency observation points in each region. Wet-bulb globe temperature (WBGT), an indicator of the risk of heatstroke occurrence, was calculated using observed meteorological data over three years from 2020 to 2023. Interestingly, areas with higher WBGT did not necessarily have more emergency medical evacuations due to heatstroke. The findings suggest that this is because the elderly are at an increased risk of heatstroke, resulting in more emergency medical evacuations due to heatstroke in areas with a high proportion of elderly people. Heat acclimatization may be relatively easy in areas with high WBGT, which could lower the incidence of heatstroke compared to areas with low WBGT. However, in the Shimabara area, where the WBGT was particularly high, the symptoms of emergency transporters due to heatstroke were more severe than in other areas, indicating that this area deserves special attention. In Nagasaki Prefecture, it is also necessary to consider effective dissemination and education methods to reduce the incidence of heatstroke.

公園池におけるイケチョウガイによる水質浄化および真珠生産の可能性について

粕谷智之, 神崎正太¹, 豊村 誠², 橋本京太郎

1 (現所属) 長崎県県民生活環境部地域環境課, 2 (現所属) 長崎県県民生活環境部資源循環推進課

用水路や池などの淡水域の水質改善および親水性の向上に資する取り組みの一つとして、淡水真珠の母貝であるイケチョウガイを利用した事業例が報告されている。本研究では、諫早ゆうゆうランド干拓の里にある池において、イケチョウガイを垂下飼育し、真珠生産を視野に入れた飼育管理手法を検討するとともに、住民参加型の取り組みへの展開を念頭に入れ、簡単に測定できる透視度を用いた水質浄化能力の評価方法の検討を行った。飼育では、2021年は飼育開始直後の4月に1個体と7月に6個体が死亡したものの、9月以降、死亡個体はなかった。2022年は上層(水深30 cm)で3個体、下層(水深50 cm)で6個体死亡したものの、死亡速度は2021年と差は見られなかった。また、夏期の成長速度は、下層で飼育した個体の方が上層の個体よりも有意に高かったことから($p = 0.02$)、高水温期は水深50 cm 以深で飼育することによって、貝の活性低下を軽減できることが示唆された。真珠生産の施術済みの貝18個体を購入し放流した結果、1個体が死亡したものの、17個体が生残り、殻長も増加したことから、公園の池のような浅い水域でも、イケチョウガイによる真珠生産は可能と考えられる。池水の透視度とイケチョウガイを飼育している筏からの距離との間には、弱い負の関係がみられたことから($p = 0.08$)、イケチョウガイによる摂餌が懸濁物の除去、すなわち水質浄化に寄与している可能性が示唆された。

キーワード: イシガイ類、淡水真珠、親水性、成長速度

はじめに

諫早湾干拓調整池(以降、調整池)は、1997年4月、国営諫早湾干拓事業のなかで、潮受け堤防が締め切られたことにより創出された。2004年12月には「諫早湾干拓調整池水辺環境の保全と創造のための行動計画」(以降、行動計画)が策定され、計画に基づき様々な水質保全対策が実施された結果、改善効果は見られているものの、調整池の水質は水質保全目標値を超過している状態が続いている^{1, 2, 3)}。行動計画では、水質浄化とともに、「自然豊かな水辺空間づくり」として、地域住民にとって身近な水辺空間づくりが示されており、親水性向上も取り組むべき課題である。

近年、大型の淡水二枚貝であるイケチョウガイ *Hyriopsis schlegelii* (図1) による湖沼等の水質改善の試みが全国各地で行われている⁴⁾。長崎県環境保健研究センターでは、2006年度からイケチョウガイによる諫早湾干拓調整池の水質浄化に関する研究に取り組んできた^{5, 6, 7, 8)}。二枚貝は植物プランクトンなどをろ過摂餌することから水質を浄化する能力がある⁹⁾。加えて、イケチョウガイは淡水真珠の母貝となることから、真珠生産を住民参加型のイベントとすること

ができる⁴⁾。これまでに行った研究により、調整池では、飼育カゴを用いて垂下飼育した場合、水深が1 m以上あれば、イケチョウガイは生残り・成長すること⁵⁾、また、水深40 cm程度の浅い場所で地撒き飼育する場合は、夏期の水温の上昇にともなう個体の疲弊に加えて、波浪による掘り起しにともなう殻体の損傷が死亡に関わっている可能性があることから、波浪を軽減する対策が必要であること^{7, 8)}、などが明らかとなった。

イケチョウガイを直接浄化対策の一つとして活用するとともに、啓発的、シンボリックに活用(例えば淡水真珠の里親制度など)する場合、住民が取り組みを目

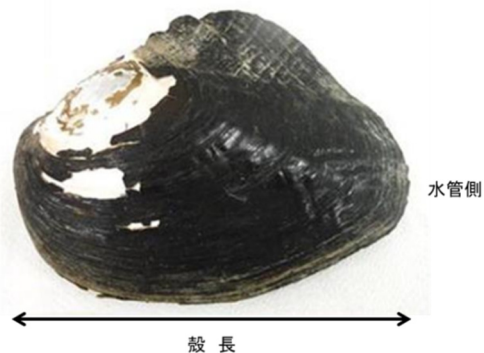


図1 イケチョウガイ外観(殻長 20 cm)

にする機会が多い場所、例えば公園の池などでイケチョウガイを飼育することが効果的である。しかし、このような場所は一般に水深が浅い上に、地撒き飼育に必要な波浪軽減施設などの設置は景観上難しい。また、個体の逸散を防ぐためには飼育カゴに入れて飼育することが望ましい。

調整池で円柱状の飼育カゴを用いてイケチョウガイを飼育したところ、浅い場所では波浪によるカゴの動揺で貝同士が接触するなどしてストレスを受け、良い成長・生残結果が得られなかった⁵⁾。殻体を個々に分けるポケット式飼育カゴは、貝同士の接触を防ぐことができるメリットがある一方で、浅い水域ではカゴ上部の飼育水深が浅くなるデメリットがあり、夏期の高水温で疲弊した個体の生残性向上に繋がるのか不明である。そこで、本研究では、諫早ゆうゆうランド干拓の里(以降、干拓の里)内の池において、ポケット式飼育カゴを用いたイケチョウガイの垂下飼育実験を行い、真珠生産を視野に入れた飼育管理手法を検討した。また、住民参加を念頭に入れ、簡単に測定できる透視度を用いた水質浄化能力の評価方法の検討を行った。

材 料 と 方 法

1 飼育実験

イケチョウガイの飼育実験は干拓の里(北緯32.845219、東経130.088539)にある池(図2)で、2021年4月～2022年1月および2022年6月～10月にかけて行った。池の面積は13,880 m²で、右のエリアはボート乗場となっていることから、飼育実験はボ-

トが侵入しない左のエリアで行った。飼育場所の水深はおよそ50 cmで、水位はほぼ一定である。飼育実験に供したイケチョウガイの飼育開始時の個体数は、2021年は109個体、2022年は130個体である。貝の殻長サイズ(図1)は106～210 mmの範囲である。2022年の飼育個体の中には、淡水真珠生産で取り入れられている無核真珠養殖、すなわち、外套膜に細胞片を挿入した18個の施術個体が含まれている。

飼育には、淡水真珠養殖などで用いられているポケット式飼育カゴ(高さ40 cm×幅60 cm)を用いた(図2)。2021年は、飼育カゴ15個にイケチョウガイを6～8個体ずつ入れ、池中央部の2カ所に設置した飼育筏から、カゴの下端が池底直上となるよう垂下して飼育した(図2)。生残数および殻長の計測は、6月から10月の期間は原則として毎月1回実施した。

生残数(計測対象は109個体)の計測は2つの飼育筏を同時に、殻長の計測については、月ごとに計測対象とする飼育筏を変えて、交互(計測対象は44個体および65個体)に実施した。生残数の確認はイケチョウガイが見えるよう飼育カゴを水面近くに持ち上げて、目視で行った。

殻長の計測は、飼育筏から外した飼育カゴからイケチョウガイを取り出し、水面に浮かべた作業用コンテナ内の池水の入ったバケツにまとめ入れた後、メジャーを用いて個々に計測した。なお、大型の個体の場合、飼育カゴの下段に入れても殻体の上部は飼育カゴ上段近くに達することから、計測後の個体は上段・下段に拘らずに飼育カゴに戻した。

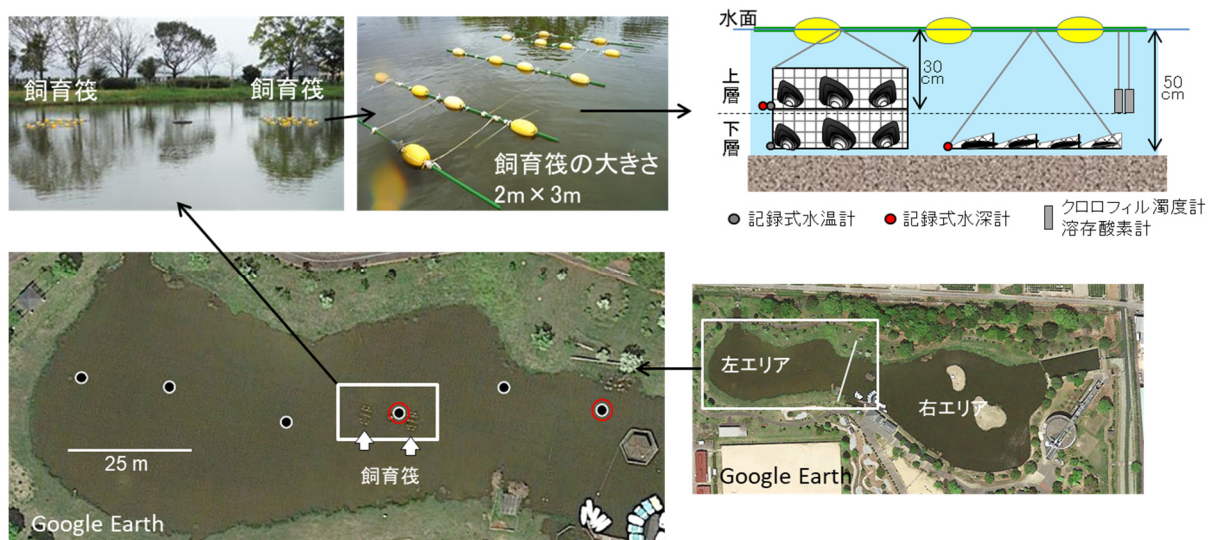


図2 飼育地点位置図および飼育方法の概略図。左下写真中の●は透視度測点、○はCOD測点を表す。飼育筏内の透視度は写真中右側の筏で測定した。

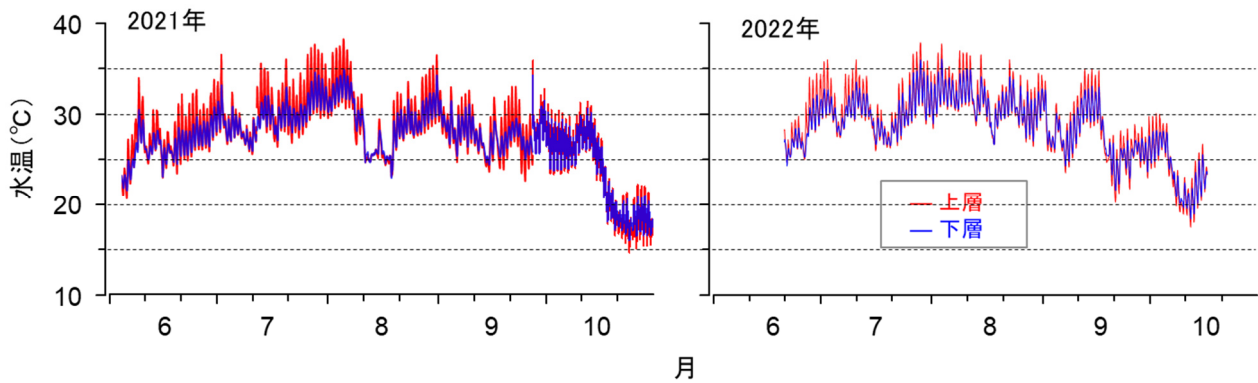


図3 2021年および2022年の水深30cmおよび50cm付近の水温の比較

2022年は、イケチョウガイの生残・成長に対する水温の影響をより明確にするために、一部の飼育カゴについては、貝を入れる面が池底直上、すなわち水深50 cmとなるように水平に垂下した(図2)。生残数(計測対象は130個体)および殻長(計測対象は34個体)の測定は、2021年と同様の頻度を予定したが、7月と8月の計測は荒天のため行えなかったため、6月、9月、10月に実施した。また、生残数および殻長の計測は、いずれも2つの飼育筏を同時に行った。

イケチョウガイの殻長および生残数の推移から、次式を用いて成長速度(%/日)および死亡速度(%/日)を算出した。

$$\text{成長速度} = 100 \cdot \ln(SL_t / SL_0) / t$$

$$\text{死亡速度} = 100 \cdot \ln(N_t / N_0) / t$$

ここで、 SL_0 および SL_t は飼育開始0日後および t 日後の殻長(mm)、 N_t および N_0 は飼育開始0日後および t 日後の生残個体数、 t は飼育日数を表す。

2 水質の測定

環境項目として、飼育カゴの中央部(水深30 cm)および下部(水深50 cm)に記録式水温計(Onset社テイドビット V2)を取り付け(図2)、水温を連続観測した。また、2021年はクロロフィル蛍光強度および溶存酸素量(DO)を、記録式のクロロフィル濁度計(JFEアドバンテック社 Infinity-CLW)と溶存酸素計(同社 Compact-DOW)を、センサー一部が水深30 cmに位置するよう筏から垂下し、それぞれを連続測定した。

その他の項目として、透視度を2021年は6回(4月、6月、7月、8月、9月、10月)、2022年は1回(9月)、飼育筏内1測点および筏周辺6測点(図2)で測定した。また、化学的酸素要求量(COD)の測定を、2021年に2測点で6回、透視度測定と同月に行

った。CODの分析方法は公定法(JIS-K0102-17)に従った。

結果と考察

1 水質

(1) 水温

水温は、2021年および2022年ともに、6月下旬から9月中旬にかけて、上層(水深30 cm付近)および下層(水深50 cm付近)で頻繁に30°C以上を記録した(図3)。この期間中、上層と下層では、日間の最高水温は下層の方が3°C前後低かったことから、池水は日中、成層していたと考えられる。一方、日間最低水温となる夜間については、上層と下層の水温に大きな差は見られないことから、池水は概ね鉛直的に混合していると考えられる。9月下旬以降、水温は徐々に低下し、上下層ともに25°C前後で推移した。2021年および2022年において水温35°C以上を記録した日数は、上層ではそれぞれ20日および21日に対して、下層では1日および3日であった。

(2) クロロフィル蛍光値および溶存酸素量

イケチョウガイの餌である植物プランクトン量の指標となるクロロフィル蛍光強度は、20前後であった(図4)。この値は、飼育実験によりイケチョウガイの成長・生残が確認された調整池ヨシ進出工内の値^{7,8)}と概ね同じであることから、干拓の里の池の餌環境はイケチョウガイに問題はないと考えられる。

DOについては、水深30 cmではDO飽和度は周年30%以上であり、貧酸素状態ではなかった(図4)。底層に近い水深50 cmのDOについては、実測データは得られていないが、前述のとおり、夜間は夏期でも池水は混合していると考えられることから、貧酸素の状態にはないと考えられる。

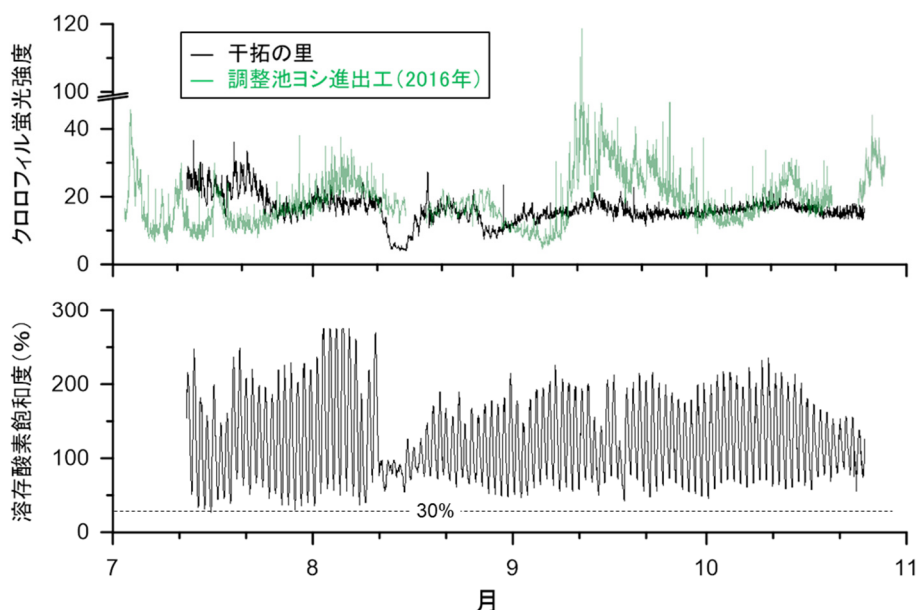


図4 2021年7月から10月の干拓の里内の池、水深 30 cm におけるクロロフィル蛍光強度および溶存酸素飽和度の推移

(3) 透視度および COD

池水の透視度と COD との関係を図5に示す。両者の間には有意な強い負の相関 ($p = 0.001$) が見られたことから、透視度は水質浄化効果を把握する簡易的な指標として有効である。

観測期間中の池水の透視度は4.3 cm～15.8 cm の範囲であり、大量降雨後の観測で10 cm 以上の高い値を示した(図6)。そこで、降雨などのイベント的な影響を軽減するために、透視度の中央値と飼育筏からの距離との関係を調べた結果、透視度は筏から離れるに従って低下する傾向がみられた($p = 0.08$)。二枚貝は植物プランクトンなどの懸濁物を摂餌により水中から除去する能力を持つことから、飼育筏で垂下飼育されている100個体以上のイケチョウガイの摂餌活動が、透視度低下の一因である植物プランクトンな

ど懸濁物の池水からの除去、すなわち水質浄化に寄与している可能性が示唆された。

2 イケチョウガイの成長および生残

(1) 成長

イケチョウガイの成長速度の平均値は、2021年は0.005～0.024%/日(図7)、2022年は上層で-0.0009～0.004%/日、下層で-0.001～0.01%/日の範囲で(図8)、両年ともに秋期に低下する傾向が見られた。また、2022年の方が夏期、秋期ともに若干低い傾向が見られた。イケチョウガイは水温30℃を超えると活性が低下し、摂餌を行わなくなる¹⁰⁾。2022年は2021年よりも水温が高い傾向が見られたことから、摂餌量が減少して成長速度が低下したと考えられる。また、飼育期間中、両年とも秋期に台風が複数回襲来した

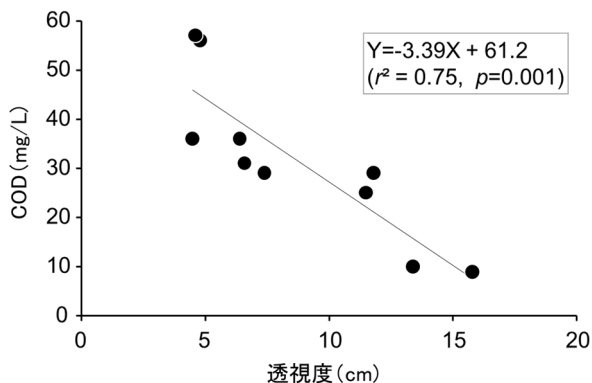


図5 透視度と COD との関係

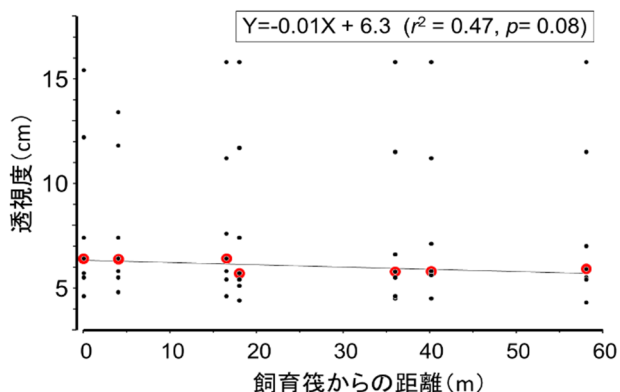


図6 飼育筏からの距離と透視度との関係。●は中央値、実線は中央値から求めた回帰直線である。

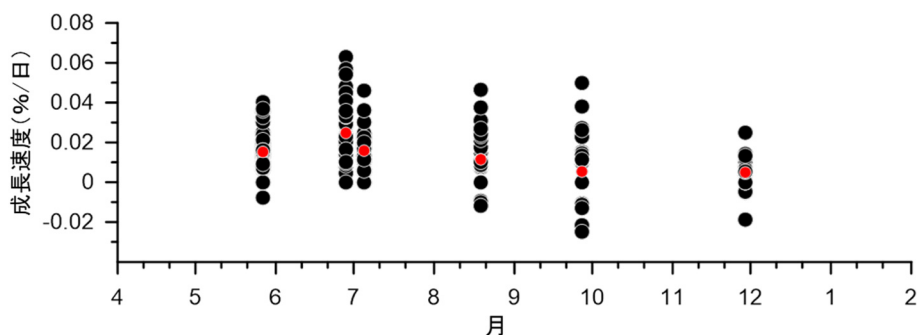


図7 2021年度のイケチヨウガイの成長速度。●は平均値。

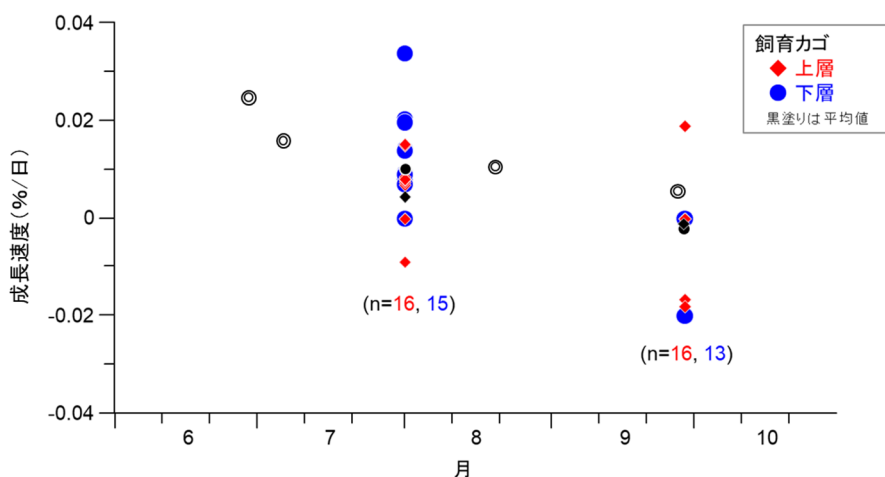


図8 2022年度の夏期(6月20日～9月12日)および秋期(9月12日～10月17日)におけるイケチヨウガイの成長速度。図中の◎は2021年度飼育実験における成長速度である。

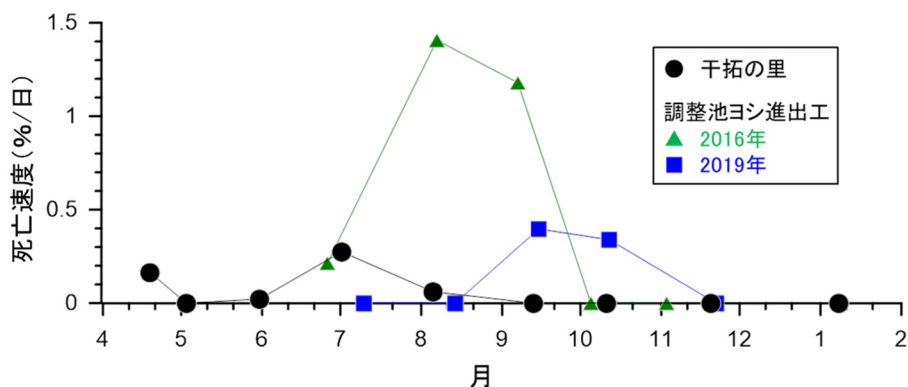


図9 2021年度のイケチヨウガイの死亡速度(●、%/日)。比較として調整池ヨシ進出工^{7, 8)}で行った飼育実験結果を▲および■で表す。

ことから、荒天により飼育カゴと殻体が擦れ、貝の殻先端が削れることによって、秋期の成長低下に繋がった可能性がある。

2022年の上層と下層の成長速度を比較すると、夏期は下層で飼育したイケチヨウガイの成長速度が上層よりも有意に高かったが($p = 0.02$)、秋期は上下層間で大きな差は見られなかった($p = 0.83$)。夏期の下層の水温は上層よりも低かったことから、下層のイケチヨウガイは上層よりも摂餌量が高かったと思われる。

(2) 生残

2021年は、飼育開始直後の4月に1個体、7月に6個体の死亡があったものの、死亡速度は0～0.27%/日の範囲であり、ヨシ進出工における飼育実

験^{7, 8)}での死亡速度(0～0.39%/日および0～1.4%/日)よりも低かった(図9)。また、9月以降、死亡個体は見られなかった。

2022年は全飼育期間を通して、イケチヨウガイは上層では3個体(うち施術個体1個体)、下層では6個体死亡した。死亡速度は上層で0.027～0.13%/日、下層で0.028～0.13%/日の範囲で、上下層との間に差は無く、また、2021年の死亡速度の範囲内であった(図10)。下層で死亡した個体の内2個体は、埋没していたと思われる飼育カゴで飼育していたことから、埋没によるストレスも死亡に繋がったと考えられる。以上のことから、干拓の里の池のような環境下でイケチヨウガイを垂下飼育する場合、夏期に水深50 cm 以深、それ以外の期間は埋没の危険性が少ない、水

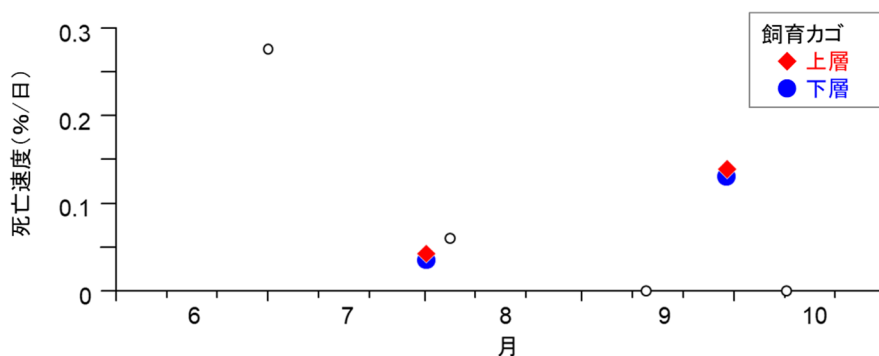


図 10 2022 年度のイケチョウガイの死亡速度 (◆ および ●、%/日)。比較として 2021 年のデータを○で表す。



図 11 淡水真珠養殖業者の指導を受けながらイケチョウガイに細胞片を挿入する施術を行う著者

深30～40 cm で貝を飼育することによって、死亡リスクを減らすことができると考えられる。

施術個体は18個体中、1個体は死亡したものの、17個体は生残した。外套膜に細胞片を挿入する方法は貝に対する負担が低いことから、挿核経験がない人でも施術可能である(図11)。一般に、イケチョウガイによる真珠生産では、真珠を取り出すまで施術個体を3年間以上飼育する必要がある。ポケット式の飼育カゴを用いることによって、また、飼育水深を季節ごとに変えることによって、干拓の里の池のような水深が浅い水域においても、同貝による真珠生産は可能と考えられる。

おわりに

イケチョウガイは最大寿命が約 40 年¹¹⁾と長い。また、真珠生産業者からの聞き取りによると、近年では、真珠母貝を殺さずに真珠を生産する方法、すなわち、外套膜から真珠を取り出した後、再び細胞片を挿入して、母貝とする方法が開発されている。貝を購入するための初期費用などが必要なものの、本研究の飼育手法を用いることによって、イケチョウガイを

親水性の向上および水質浄化に資する持続的な取り組みへ活用することができると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 長崎県：諫早湾干拓調整池水辺環境の保全と創造のための行動計画，長崎，(2004)。
- 2) ー：第2期諫明寄干拓調整池水辺環境の保全と創造のための行動計画，長崎，(2008)。
- 3) ー：第3期諫早湾干拓調整池水辺環境の保全と創造のための行動計画，長崎，(2019)。
- 4) 戸田市政策研究所：池蝶貝を活用した水質浄化とブランド化に関する展望，2008年度 戸田市政策研究所 調査研究報告書，24～42 (2009)。
- 5) 石崎修造，浦 伸孝，右田雄二：イケチョウガイによる諫早湾干拓調整池の水質浄化に関する研究，長崎県環境保健研究センター所報，3，47～52，(2007)。
- 6) 陣野宏宙，船越章裕，玉屋千晶，富永勇太，山内康生：諫早湾干拓調整池におけるイケチョウガイの地蒔き飼育の可能性に関する研究，長崎県環境保健研究センター所報，61，72～78(2015)。
- 7) 粕谷智之，陣野宏宙：諫早湾干拓調整池における淡水産二枚貝イケチョウガイの飼育，長崎県環境保健研究センター所報，62，32～39 (2016)。
- 8) 粕谷智之，豊村 誠，橋本京太郎，前田祐加，本多洋幸：諫早湾干拓調整池におけるイケチョウガイの成長・生残に関わる波浪緩和施設の効果，長崎県環境保健研究センター所報，67，58～65(2021)。
- 9) 川瀬基弘：日本産イシガイ類による炭素・窒素

- 除去, 陸の水, 43, 71~81(2010).
- 10) 藤原公一:イケチョウガイ稚貝のへい死に先立つ濾水量の減少とその一原因, 平成3年度滋賀県水産試験場事業報告, 9~10(1992).
- 11) 近藤高貴:イケチョウガイ, 日本の希少な野生生物に関する基礎資料(I), 25~32, 日本水産資源保護協会, 東京, (1995).

Assessment of water purification and pearl production potential of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis schlegelii* in a park pond

Tomoyuki KASUYA, Syota KANZAKI ¹, Makoto TOYOMURA ¹, Kyotaro HASHIMOTO

1 Present address: Nagasaki Prefectural Government

In recent years, there has been growing interest in using the freshwater pearl mussel *Hyriopsis schlegelii* to improve the water quality and hydrophilicity of freshwater areas such as irrigation canals and ponds. In this study, we cultured *H. schlegelii* in a pond at Isahaya Yuyu Land Kantaku-nosato Park from 2021 to 2022 to investigate a rearing procedure to improve survival rates, considering the development of water purification efforts by the mussel combined with pearl production. Despite the deaths of one and six individuals in April and July 2021, respectively, no further deaths occurred after September, and the instantaneous mortality rate was lower than those reported in previous culturing studies in the Isahaya Bay reclamation regulation pond. In 2022, despite the deaths of 3 individuals cultured at 30 cm depth and 6 individuals cultured at 50 cm depth, the instantaneous mortality rate at both depths was nearly identical and within the range of those observed in 2021. The instantaneous growth rate at 50 cm was significantly higher than at 30 cm depth in the summer ($p = 0.02$). In 2022, 18 pearl-producing individuals of *H. schlegelii* were cultured in a park pond, and 17 survived as well as increased in size, suggesting that pearl-producing by *H. schlegelii* is feasible in these areas. The weak negative relationship between a pond water transparency and distance from the *H. schlegelii* culturing area ($p = 0.08$) suggests that the feeding activity of the mussel may contribute to the removal of suspended matters, such as phytoplankton, from a water column (i.e., water purification).

Key words: unionid mussels, phytoplankton, transparency, growth rate, mortality rate

インシリコ解析/LC-MS検出法に基づく新型コロナウイルス検査の実用性評価

辻村 和也, 松本 文昭, 吉川 亮, 田栗 利紹

近年、インシリコ解析により、SARS-CoV-2に特異的なペプチドを選抜して、直接イオン化し、LC-MSで検出するターゲットプロテオミクスがReverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)を補完する手法の1つとして提案されている。本研究では、地衛研の理化学検査で汎用的に使用している高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS) を用い、RT-qPCRの結果を踏まえ、当該LC-MS法の実用性を陽性患者を含む鼻咽頭ぬぐい液40検体を用い検討した。ターゲットプロテオミクス標的のSARS-CoV-2を構成するウイルスタンパクとしてNucleocapsid protein (NCAP)とSpike protein (SPIKE)とした。その結果、RT-qPCR結果相当でCt値23.54以下の22検体でSARS-CoV-2特異ペプチドが検出され、臨床検体保存液別のLC-MSによるlog₂ SumAreas 値とRT-qPCRのCt値には、ウイルス輸送液で $r=-0.821$ 、生食もしくはPBSで $r=-0.863$ と高い相関性が確認された。また、Delta株NCAP中のD377Y変異もLC-MS分析で確認できた。今後、陰性判断する検査への適用は感度の課題があるが、ウイルスタンパク質を直接ターゲットにしたRT-qPCRを補完する技術の一つとして期待でき、SARS-CoV-2以外にも応用可能であると思われる。

キーワード：インシリコ解析、ターゲットプロテオミクス、LC-MS、SARS-CoV-2、RT-qPCR、新型コロナウイルス感染症

はじめに

パンデミックとして猛威を振ったCOVID-19は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)の爆発的な感染実態やRNAウイルス進化に基づくSARS-CoV-2変異株の頻出により、地方衛生研究所(地衛研)において常用される遺伝子検査の補完技術の検討は喫緊の課題となっている。近年、探求が進められている新しい診断法の中で、インシリコ解析により、SARS-CoV-2に特異的なペプチドを選抜して高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で検出するターゲットプロテオミクス法が、Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)を補完する手法の1つとして提案されている。SARS-CoV-2の遺伝子変異のスピードの速さを考慮すると、一貫性が最も重要な臨床の現場において、ウイルスタンパク質由来の特異ペプチドを迅速に検出し、遺伝子探索では対応できないペプチド残基からのアプローチを可能にする本技術は魅力的な検出法である。

本研究では、内径 0.1 mmのナノカラムを用いたnano-LC/MS(MS)やMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)-MS等のタンパク質解析に特

化した質量分析装置でなく、残留農薬分析、違法薬物分析、健康危機管理等で地衛研の理化学検査で汎用している内径2 mm程度のセミマイクロカラムのシステムを用いた2種のLC-MS(高速液体クロマトグラフ三連四重極タンデム質量分析装置(LC-QqQ-MS)及び高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF-MS)を用い、RT-qPCRの結果を踏まえ、当該LC-MS法の実用性を検討した。

なお、本研究は日本公衆衛生学会新型コロナウイルス対策調査研究・実践開発推進助成(奨励賞)で実施した。

材料および方法

既報¹⁾⁻⁹⁾を参考にし、概要として図1の流れで研究を実施した。各項目における詳細を以下に示す。

1 インシリコ解析

インシリコ解析のため、SARS-CoV-2構成タンパク質であるNucleocapsid protein (NCAP)とSpike protein (SPIKE)のアミノ酸配列をUniProt (NCAP: P0DTC9, SPIKE: P0DTC2)から入手し、トリプシン消化で生成されるペプチドをオープンソースのター

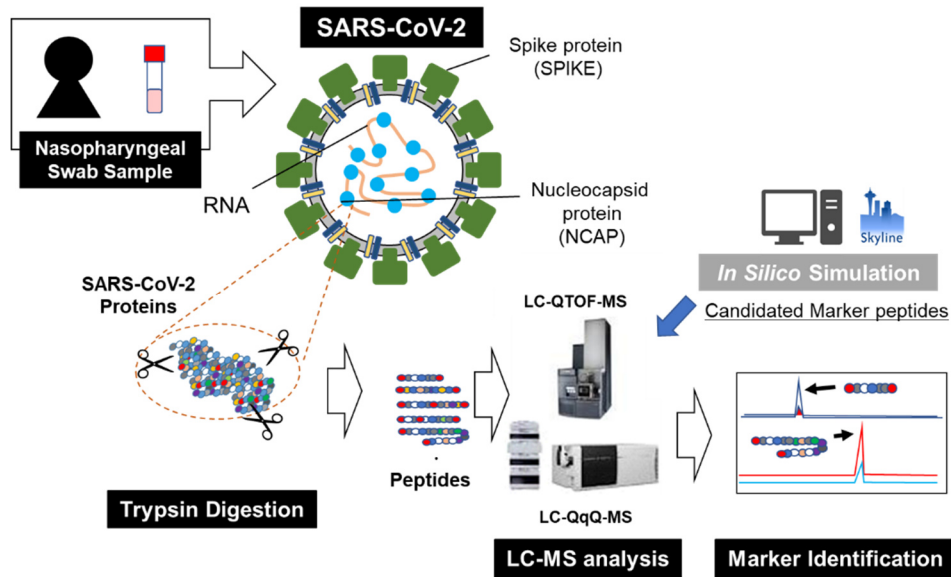


図1 LC-MSによるSARS-CoV-2検出系概要

ゲットプロテオミクスソフトウェアの Skyline (Developer(s): Brendan X. MacLean *et al.*) でシミュレーションした。また、ヒトタンパク質由来のペプチドをバックグラウンドと設定し、同じ配列のペプチドを除き、インシリコ解析でSARS-CoV-2検出分析の候補ペプチドを一次選定した。

インシリコで一次選定された各ペプチドと実験的なデータとの整合性を図るために、組換タンパク質によるトリプシン消化及びLC-MS分析を繰り返し行い、検出に必要なトランジションの選定及びその時の最適な電圧等を最適化した。また、溶出時間も確認し、各LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析に必要なモニタリングメソッドを構築した。

2 試薬

SARS-CoV-2を構成する組換タンパク質として、Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein with His tag (ABclonal社)およびRecombinant SARS-CoV-2 S1+S2 ECD(S-ECD) Protein with His tag (Wild type, pre-fusion state plus post-fusion stage)(AB clonal社)を購入した。ウイルス不活化及び濃縮に用いたプロテオミクス用アセトンは、富士フィルム和光純薬製を用いた。ウイルス輸送培地 (VTM) は、極東製薬工業製を用いた。タンパク質消化に用いた消化酵素は、プロメガ社製のTrypsin / Lys-C Mix, Mass Spec Gradeを用いた。また、酵素消化及び溶解液として用いた緩衝液は、重炭酸トリエチルアンモニウムバッファー (TEABC) (Sigma社製) を希釈し用いた。その他LC-MS等に用いた試薬は、

質量分析グレードのものを用いた。

3 前処理

前処理操作には、タンパク質低吸着のマイクロチューブ (住友ベークライト社製)、フィルターチップ (Thermo Scientific社製) 及びLC-MSバイアル及びキャップ (AMR株式会社) を用いた。

前処理法を、図2に示す。組換タンパク質添加VTMまたは鼻咽頭ぬぐい液検体を50 µL分取し、氷冷したアセトン450 µLを添加混合し、ウイルスの不活化及びタンパク質を沈殿し、遠心分離 (0、16,000 g、10分) した。得られた沈殿タンパク質に再度アセトン450 µLを加え同様の操作を行った。40 乾燥でアセトンを蒸発させた後、500 mMに調製し

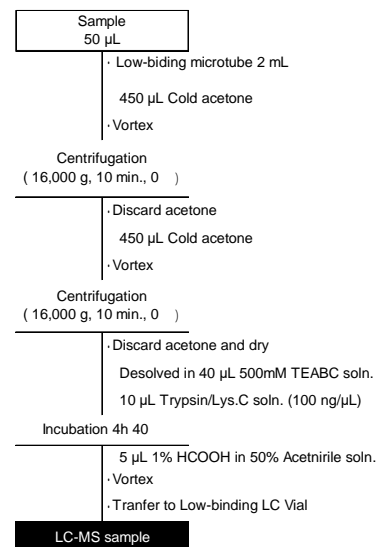


図2 前処理フロー

たTEABC溶液40 μLに溶解し、0.1 μg/μLに500 mM TEABC溶液に調製したTrypsin/Lys-C Mixを10 μL添加し、穏やかピペティングした後、ヒーティングブロック(HF200、アズワン社製)40 °Cで4時間酵素処理を行い、1%ギ酸含有50%アセトニトリル溶液5 μLを添加し反応を停止し、遠心分離後上清をLCバイアルに移し、これを各LC-MS装置に供した。

4 LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析

高速液体クロマトグラフ三連四重極タンデム質量分析計(LC-QqQ-MS)は、アジレント・テクノロジー(株)製1290 Infinity LC/6460を使用した。また、超高速液体クロマトグラフ四重極-飛行時間型タンデム質量分析計(LC-QTOF-MS)は、ウォータース(株)製 Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS QToFを使用した。ペプチド分析カラムは、ウォータース(株)製のACQUITY Premier Peptide BEH C18 Column(300 μm, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm)に同社製ACQUITY Column In-Line Filterを連結し用いた。移動相Aとして0.1%ギ酸、移動相Bとして0.1%ギ酸含有アセトニトリルとし、流量0.6 mL/分でグラジエン

表1 LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析条件

<Instrument>	
LC-Q-TOF-MS : Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS Qtof (Waters, Ltd.)	
LC-QqQ-MS : Agilent 1290/6460 LC-MS/MS (Agilent Technologies, Ltd.)	
<LC>	
Column: ACQUITY Premier Peptide BEH C ₁₈ Column (300 μm, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm, Waters, Ltd.)	
Mobile phase:	Gradient table
A) 0.1% Formic acid	Time (min) A (%) B (%)
B) 0.1% Acetonitrile	0 95 5
Column temperature: 40°C	5.5 67 33
Flow rate: 0.6 mL/min	5.5 10 90
Injection volume: 10 μL	7 10 90
Autosampler temperature: 10°C	7.1 95 5
	8 95 5
<Q-TOF-MS conditions>	
* Ionization mode: ESI (Positive)	
* Source temperature: 150°C	
* Desolvation temperature: 600 °C	
* Capillary voltage: 0.5 kV	
* Cone voltage: 80 V	
* Measurement mode:	
<data-independent MS/MS (MS ²)>	
* Collision energy: low energy 0 V, high energy 20-50 V (ramping)	
* Scan range: m/z 100-800	
<TOF-MRM>	
* MRM window : Isotope cluster	
<QqQ-MS conditions>	
* Ionization: AJS positive mode	
* Scan Mode: Dynamic MRM	
* Gas temp: 350°C	
* Gas Flow: 10 l/min	
* Sheath gas Temp: 400 °C	
* Sheath gas flow: 10 L/min	

ト分析した。その他の条件を含め表1に示す。

5 鼻咽頭ぬぐい液検体

行政検査のために搬入された患者鼻咽頭ぬぐい液を用いた。検体は、定量リアルタイムPCR (RT-qPCR) のCt値をもとに、『Ct 10-20』: 11検体、『Ct 20-30』: 15検体、『Ct 30-40』: 5検体及び『陰性試料』: 9検体の計40検体とした(表2)。また、表2の検体番号に下線を引いた検体は、鼻咽頭ぬぐい液がPBSもし

くは生理食塩水により懸濁・保存されていた。RT-qPCRは、「新型コロナウイルス感染症病原体検出マニュアル」(<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) に準じて実施した。

なお、本研究は、「インシリコ解析/LC-MS検出法に基づく新型コロナウイルス検査の実用性評価(環保研倫10-1)」として当センターの倫理審査委員会において承認された。

表2 鼻咽頭ぬぐい液検体リスト及び各検体のRT-qPCRのCt値

Group	No.	Strain	Ct Value	Group	No.	Strain	Ct Value	
Ct 10-20 (11)	1	Delta	14.83	Ct 30-40 (5)	27	Delta	30.56	
	2	Omicron	16.43		28	Estimated Delta	33.85	
	3	Delta	16.72		29	Not Determinable	38.03	
	4	Omicron	17.26		30	Not Determinable	38.62	
	5	R1	18.32		31	Not Determinable	39.56	
	6	Alpha	18.35		Negative Sample (9)	32	-	Undetermined
	7	Omicron	18.61			33	-	Undetermined
	8	Omicron	18.73			34	-	Undetermined
	9	Omicron	18.97			35	-	Undetermined
	10	Alpha	19.13			36	-	Undetermined
	Ct 20-30 (15)	11	Omicron		19.36	37	-	Undetermined
12		Omicron	20.06	38	-	Undetermined		
13		Omicron	20.34	39	-	Undetermined		
14		Omicron	20.55	40	-	Undetermined		
15		Delta	20.56	Undeline: PBS or Saline, Others : VTM				
16		Alpha	21.14					
17		Omicron	21.53					
18		R1	21.56					
19		Omicron	21.63					
20		Omicron	21.73					
21		Omicron	21.75					
22		Delta	22.81					
23		Omicron	23.10					
24		Omicron	23.54					
25		Alpha	26.13					
26	Delta	26.31						

6 RT-qPCRとの比較

鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MSデータは、Skylineに取り込み解析し、得られた各ペプチドの各ランジッションのピークの面積和を用い、各Ct値グループの傾向を検討した。各検体のペプチドピーク面積合計値をシグナル(S)、同溶出時間の『陰性試料』の面積合計値をノイズ(N)とし、S/N比3以上のペプチドについて検出とし、検出された各ペプチドピーク面積の合計値のLog2値(log2_SumAreas)とRT-qPCRのCt値の相関性を検証した。また、検体溶解液について、VTM以外のPBSもしくは生理食塩水の検体があったため、それぞれ鼻咽頭ぬぐい保存液ごとに相関性を検証した。

7 LC-MS分析の変異株検出の可能性検討

モニタリングメソッド搭載のペプチド配列について、SARS-CoV-2変異株のアミノ酸情報のあるWebデータベースで探索し、実検体での検出可能性について検討した。データベースとして、スタンフォード大学のCORONAVIRUS ANTIVIRAL & RESISTANCE DATABASE (<https://covdb.stanford.edu/page/mutation-viewer/>) の“SARS-CoV-2 Variants”を参照した。

結果

1 インシリコ解析によるトリプシン消化ペプチド選定
 Skylineを用いたNCAP (419アミノ酸) 及びSPIKE (1273アミノ酸) タンパク質のインシリコトリプシン消化のフロースキームを図3に示す。酵素消化ミス、生成ペプチド長さ、イオン価、イオンタイプ及びバックグラウンド減算を条件とした。その後、既知のWEBデータベースと比較し、その結果、SPIKEとして36ペプチド、879トランジションが、NCAPとして39ペプチド、904トランジションが候補として挙げられた。

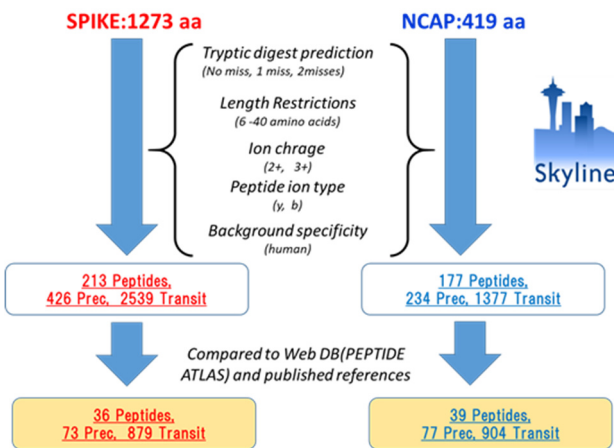


図3 インシリコ解析によるSARS-CoV-2 特異ペプチドマーカ－選択フロースキーム

2 組換タンパク質による検証

インシリコ消化で選定されたペプチドについて、図4のフロースキームでLC-QTOF-MS及びLC-QqQ-MSそれぞれで組換タンパク質による検証を行った。

LC-QTOF-MSについては、2段階の分析及びSARS-CoV-2検出ペプチドマーカ－選択を行った。1段階目は、データ非依存型のデータ取得法であるMSeモードで分析を実施し、各ペプチドのトランジションのピーク強度をもとに選択した。2段階目は、選択されたペプチドのトランジションに対し、MSeモード測定より、選択性と感度が良いTOF-MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード分析を実施し、同じくピーク強度をもとにLC-QTOF-MSによるSARS-CoV-2検出マーカ－を選定した(図4A)。一方、LC-QqQ-MSについては、条件最適化のために3段階の分析を行い、SARS-CoV-2検出に有効なペプチドマーカ－を選択した(図4B)。1段階目は、インシリコで選択されたペプチドのトランジションすべてについてMRM条件を暫定的に設定し、LC-QTOF-MS同様に各ペプチド及びそのトランジションを選

択した。2段階目は、暫定的に設定していたMRM条件の最適化、3段階目にその確認分析を実施し、LC-QqQ-MSによるSARS-CoV-2検出マーカ－を選定した。

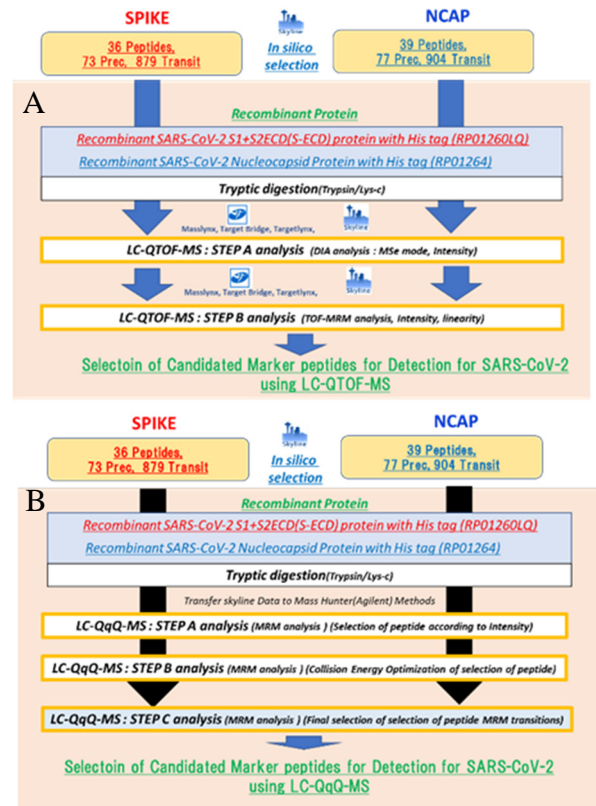


図4 LC-QTOF-MS(A)分析及びLC-QqQ-MS (B)によるSARS-CoV-2 特異的ペプチドマーカ－選択フロースキーム

それぞれの機器で選択されたSARS-CoV-2検出候補マーカ－について、組換タンパク質添加VTMを用いて、更なるマーカ－候補選定を実施した。その結果、NCAPとして、8ペプチド、8プレカ－サー、17トランジション、SPIKEとして、3ペプチド、3プレカ－サー、6トランジションを選択した。また、感度や機器の安定性等を考慮し、患者鼻咽頭ぬぐい液検体分析機器として、LC-QqQ-MSを選択した。この分析における各ペプチドのTransition、溶出時間、Fragmentor (V) 及びCollision Energy(eV)も表3に示す。また、今回選択されたペプチドのそれぞれのタンパク質上の位置について図5に青字で示す。

表3 特異的ペプチドマーカー及び分析条件情報

Protein	Peptide	Charge	Transition	RT (min)	Precursor Ion (m/z)	Fragmentor (V)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (eV)	
NCAP	DGIHWATEGALNTPK	842.9489++	V [y11] - 1100.5946+	4.35	842.9	135	1100.6	24.1	
			A [y10] - 1001.5262+				1001.5	24.1	
			T [y9] - 930.4891+				930.5	27.1	
	NPANNAIVLQLQGDTLTPK	687.3881+++	P [y8] - 841.4778+	4.13	687.4	135	841.5	16.9	
			V [b9] - 865.4526+				865.5	19.9	
	LNQLESK	416.2322++	N [y6] - 718.3730+	0.82	416.2	135	718.4	10.9	
			L [y4] - 476.2715+				476.3	10.9	
			S [y2] - 234.1448+				234.1	13.9	
	AYNVTAQAFGR	563.7856++	N [y8] - 892.4635+	2.59	563.8	135	892.5	15.5	
			IGMEVTPSGTWLTYTGAIK				675.6836+++	L [y8] - 866.4982+	4.56
							T [y7] - 753.4141+	753.4	13.5
							DQVILLNK	471.7846++	V [y6] - 699.4763+
							L [y4] - 487.3239+	487.3	15.6
							ADETGALPQR	564.7858++	A [y5] - 584.3515+
							P [y3] - 400.2303+	400.2	15.5
							QQTVTLPAADLDFSK	931.4807++	L [y11] - 1191.5892+
							P [y10] - 1078.5051+	1078.5	29.9
							SPIKE	GWIFGTTLDISK	612.8166++
							F [y8] - 868.4411+	868.4	20.0
							FLPFQGFGR	570.3035++	P [y7] - 879.4472+
							F [y6] - 782.3944+	782.4	21.7
							SFIEDLLFNK	613.3268++	E [y7] - 878.4618+
							D [y6] - 749.4192+	749.4	20.0

sp1|PDDTC9|NCAP_SARS2 Nucleoprotein

MSDNGPQNRNAPRITFGSPDSTGNSQNGERSGARSQRPPQLPNTASWFTALTOHGKEDLKFRGGQVPINTSSPDDQIGYY
RRAATRIRGGDKMKDLSPRWYYWLTGPEAGLPLVYGANIKDGIHWATEGALNTPKDHGTRNPANNAIVLQLQGDTLTPKFGYAEIGS
RGGSAQSSRSRNRSSNPSTGSRGTPARMANGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGGQQGQVTKKSAEAASKPRKQRTA
TKAYNVTAQAFGRGPEQTQNGFDQLRQGTQYKHWPLQIAGFAPSAAFGRMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPFKDQVLA
LNKHAYDTAFTPEPKDKKKKADETQALPQRKQKQVTLPAADLDFSKLQSSMSSADSTQA

sp1|PDDTC2|SPIKE_SARS2 Spike glycoprotein

MFVFLVLPVSSQCVLITRQLPPATNSFTFRGVYVYDVKFRSSVLHSTQDLFFPSSVWFAHIVSGTNGKRFDNPLVFNDDGVY
FASTKSNIRHWIQTGLDSTQGLLNNIATVIVKCEFCQCNDFPLVYHYKKNVWSESVYSAANNCTFEYSQFLNIDLEGK
QGNFKNLREFNKNIDGVYKYSKHTPINVDRPLPGSFALEPVDLPIGINTFRQTLALHRSYVLPDSSSGWTAAGAAVYGLPQRTFL
LYNENGTDAVDCALDPLETKLTKSFTEKGIQVQSNFRVQTESVIRFPNTNLCPGEVFNATRFASVYAWNRKRSNCVADVSIVY
NSA5SF3KCYGVSPTKLNDCFTVYVADSFVIRSDGVRQIAPGGTGKJADHYKLPDPTGCVIAWNSNLDKXGNGVHNHYRFRKYS
NLKPEERDSTETVAGSSTPCVGEFGNCFPLDSTGQPTINGVGYQYPRVYVLLFELLHAPATVCGPKSTLWUKKVCNENFNLGTGT
VLTENKFLPFQGFGRDIADTDAVRDPTLELDITPCSGGVSIVITPNTNSQVAVLQDVNCTEVPVAHADQLTPWRYVYSGTNSV
FQTRAGCLIGAEHVNNSYECDDIPGAGICASYQTQNSPRRAEVSASQSIATMSLGAENSVAVSNNSIAIPNFITSVTEILPMSMTKTSVD
CTMYGDSSTCSNLLQYGSCTQRLNRLIAGVQDKHTQVEAGVQKQYKTPKDFGGNFSQILPDPKSKRSKEDLLNFKVNTLAD
AGFKYQKDCLDIAARLCAQKNSGLTYPLLLDIEMAIQYTSALLAGTISWTGFGAGAALQIPFAMQYRFRNGIGVQTVNLYENQK
LIANQFNSAIGKIQDLSLSTASALGKLQDVVQNAQALNTLVKQSSNFGAISVNLNLDLSLDKVEAEVQIDRLITRGLQSLVTVYQQIR
AERASANLAIATMSSEVLQSKRVDFCGYVHMLSPQSAFHVFLHVTYVPAQEKNFITPAICHDGKAHFHFEVGVVSYNGHW
FYTORNYEPOITTDITFYSGCQDVIGHWNTYDQLPELDSKSELDKYSKYNTPDQVLDLDSIGNASVWVWQKEDLNENKLNLE
SLDQLQELQYKWPWYIWLGIAGLIAVMTYMLCCMTSCSCLGKCCSCGCKFEDDSEPVKLGKLYHT

図5 SARS-CoV-2特異的ペプチドマーカーの
の各タンパク質上の位置

3 鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MS分析及び
RT-qPCR結果との比較

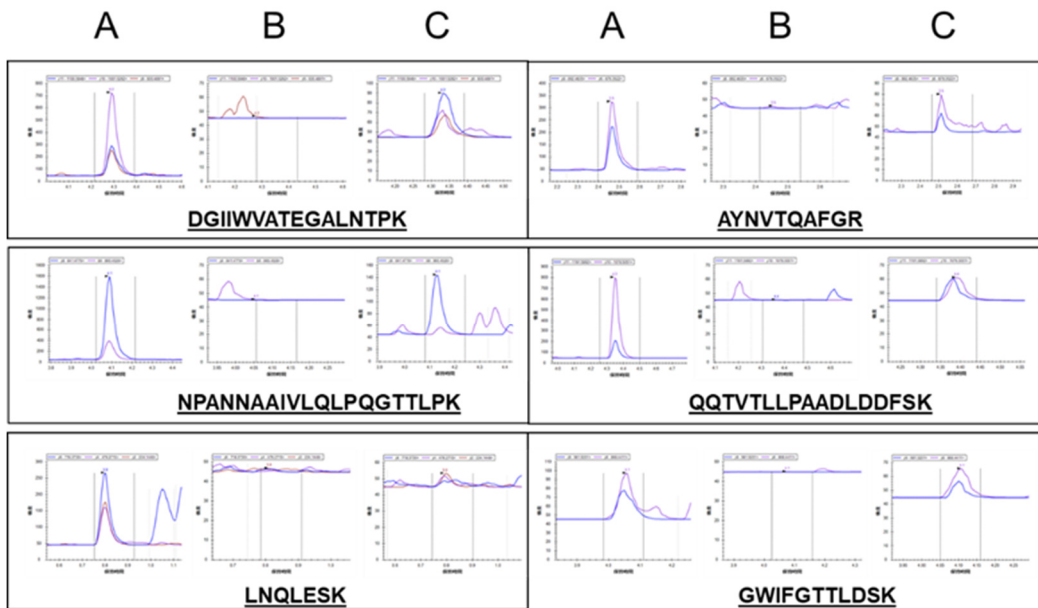
(1) 鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MS分析

表1及び3の条件により、鼻咽頭ぬぐい液40検

体の分析を実施した。今回、LC-QqQ-MSによる SARS-CoV-2検出の判断として、少なくとも3種のペプチドの検出とし、また各ピーク検出の基準をネガティブコントロール検体の各ペプチドのトランジションにおける面積を用い、平均値を算出(N)し、その値に対してS/N > 3以上であればそのペプチドのトランジションは検出と判断した。その結果、40検体中22検体はLC-QqQ-MSにより、SARS-CoV-2検出と判断された。その内、RT-qPCRの結果と照らし合わせると¹Ct 10-20₃:11検体全て、また¹Ct 20-30₃:15検体の内11検体であり、それらの検体のCt値は、23.54以下であった。それ以上のCt値ではLC-QqQ-MS分析ではSARS-CoV-2検出と判断できなかった。各検体

表4 SARS-CoV-2検出検体及びその特異的ペプチド一覧

Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide		
1	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	5	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	9	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	13	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	18	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK	22	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK
2	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	6	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	10	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETGALPQR GWIFGTTLDISK	14	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	19	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK DOVLLNK	24	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR
3	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	7	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	11	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR GWIFGTTLDISK	15	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	20	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR		
4	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	8	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	12	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR	17	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	21	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQLQDGTTLTK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETGALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR		



A:Recombinant NCAP spiked VTM sample (4 fg/uL), B:Negative patient sample., C:Positive patient sample 7.

図6 代表的なSARS-CoV-2特異的ペプチドマーカにおけるMRMクロマトグラム

において検出されたペプチド一覧を表4に示す。また、図6にNCAP組換えタンパク質を添加したVTMサンプル、RT-qPCRで陰性検体(Ct値:>40). 及び陽性判断された検体7 (Ct値=18.61)のMRMクロマトグラムを示す。

(2) LC-QqQ-MS分析データとRT-qPCRとの比較

LC-QqQ-MS分析で検出された22検体(Ct値:14.83-23.54)について、検出された各ペプチドピーク面積の合計値のLog2値(log2_SumAreas)とRT-qPCRのCt値の相関性を検証した(図7 A)。その時の相関係数(r)は、 $r=-0.636$ と相関性があることが確認された。更に、本研究における患者鼻咽頭ぬぐい液の保存液は、VTM以外にPBSもしくは生理食塩水(検体1, 4, 8, 11, 13, 14, 17, 20, 21, 24)が確認され、予備試験で組換えタンパク質を用いたLC-QqQ-MS分析においてバックグラウンドノイズも異なることから、保存液別に相関性についても検証した(図7 B)。その結果、保存液としてVTMを用いた検体グループ(Ct値:16.43-22.81)での相関係数は、 $r=-0.821$ 、PBSもしくは生理食塩水を用いた検体グループ(Ct値:14.83-23.54)では、 $r=-0.863$ と非常に高い相関性が確認された。

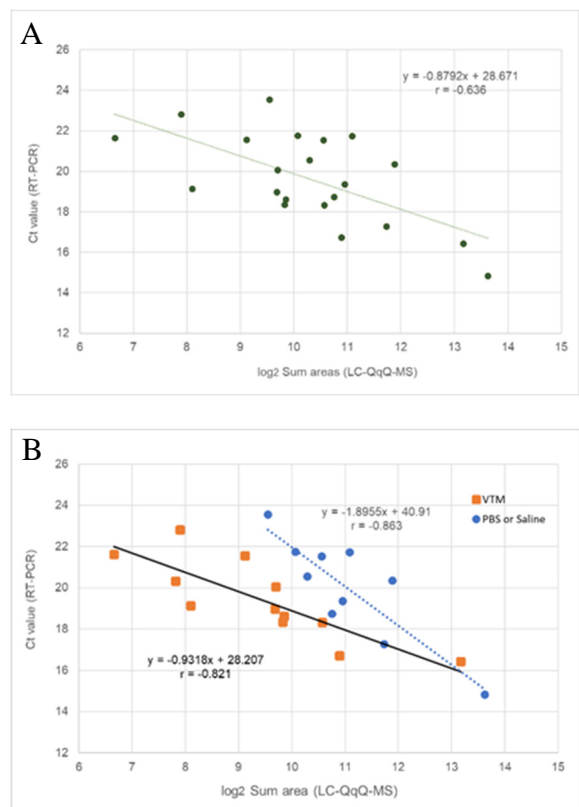


図7 NCAPにおけるLC-QqQ-MSとRT-qPCRとの相関 (A:22検体の相関、B:保存液別相関)

4 SARS-CoV-2変異への適用可能性

本研究で選択されたSARS-CoV-2検出ペプチドマーカー11種について、現在確認されている変異株におけるアミノ酸置換について探索した。その結果、NCAP由来の3ペプチドマーカーについて変異株検出の可能性がみいだされた(表5)。

表5 ペプチドマーカーとSARS-CoV-2変異株およびNCAPにおける変異部位

Peptide maker	SARS-CoV-2 variant	Mutation position on NCAP
N ^P ANNAAIVLQLPQGTTLPK	BA4(Omicron)	P151S
IGMEV ^I P ^S GTWLTYYTGAIK	B.1.616	T325I
	AY5	S327L
A ^D ETQALPQR	B.1.617.1 B.1.617.2 and AY(Delta) B.1.617.3	D377Y

LC-QqQ-MS分析でSARS-CoV-2検出と判断された22検体のうち、表5に該当する変異株検体はSample 1、3及び15のDelta株であった。

そこで、NCAPの377位のアミノ酸をD(アスパラギン酸)からY(チロシン)に置換されたDelta株変異ペプチドである『AYETQALPQR』のLC-QqQ-MS分析条件をSkylineで再計算し、Sample 1、3について再度LC-QqQ-MS分析し、SARS-CoV-2変異への適用可能性を検証した。その結果、Sample 1、3においては、従来株由来の組換えNCAPとSample 13(Omicron株)で確認される『ADETQALPQR』ペプチドピークは検出されず、Delta株変異特有の『AYETQALPQR』のペプチドピークが検出された(図8)。

考 察

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)は、重症呼吸器疾患であるコロナウイルス病2019(COVID-19)の原因物質であり、その検出手法のゴールドスタンダードは、RT-qPCRである。しかしながら、それを補完する検出技術の開発も必要であり、そのひとつが、プロテオミクス手法による質量分析(MS)である。

我々は、地方衛生研究所で残留農薬分析、違法薬物分析及び健康危機管理における原因物質特定等の理化学分野で汎用的に使用されている2種のLC-MS(LC-QTOF-MS、LC-QqQ-MS)を用い、患

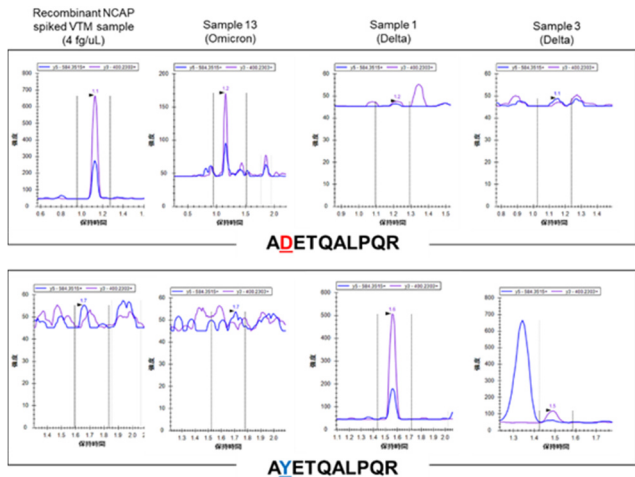


図8 Delta株 NCAP中変異ペプチドのLC-QqQ-MSクロマトグラム

者鼻咽頭ぬぐい液中のSARS-CoV-2を構成するNCAP及びSPIKEタンパク質をRT-qPCRにおける遺伝子増幅や特殊な試薬を用いることなく、それらタンパク質中のSARS-CoV-2特異的ペプチドのマーカー11種をインシリコ解析と実分析を組み合わせ選別及び検証した。最終検証として、陰性検体を含む鼻咽頭ぬぐい液40検体を用いた。

その結果、RT-qPCR相当でCt値23.54以下の鼻咽頭ぬぐい液22検体からSARS-CoV-2特異ペプチドが複数確認され、ウイルス検出陽性と判断できた。また、変異株の適用性検証の結果、ペプチドマーカーの一種『ADETQALPQR』がDelta株変異の検出が可能であった。

現状、陰性判断としてはRT-qPCRでCt値が40以上であり、感染能力の目安としての様々な報告¹⁰⁾⁻¹⁴⁾では、Ct値30~35付近で考察がされている。例えば、Obaらの報告¹⁵⁾では、社会活動範囲の目安としてCt値30未満で他者への感染リスクが極めて高いと考え、速やかに隔離及び接触者追跡を開始し、検査を受けた人には医療機関を受診し、必要な治療を受けるよう指導すると提唱している。現状、これらの点においても感度面で課題があると思われるが、Hoberらは、検体保存液にPBSを用い、SARS-CoV-2 NCAP特異的抗体を用い、NCAPタンパク質を精製、濃縮し、LC-QqQ-MS分析を実施することでCt値21~34の範囲で定量的に検出できるとしている⁵⁾。今後、試料量の増加や前処理法の改良、濃縮などの高感度化への更なる検討が必要と思われるとともに感染拡大防止と社会経済活動を両立させるための実質的なCt値の調査等も必要であると考えられる。しかしながら、ウイルスタンパク質を増幅や蛍光色素などを用いず、

直接イオン化し検出できるターゲットプロテオミクス LC-MS法は、RT-qPCRを補完する技術の一つとして期待でき、公衆衛生学分野だけでなく、その他の分野でも応用可能であると思われる。

参考文献

- 1) Bart Van Puyvelde. *et al.*, Cov-MS: A Community-Based Template Assay for Mass-Spectrometry-Based Protein Detection in SARS-CoV-2 Patients., *JACS Au*. 2021 Jun 28;1(6):750-765.
- 2) Benjamin C. Orsburn. *et al.*, In silico approach toward the identification of unique peptides from viral protein infection: Application to COVID-19. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383>.
- 3) Conor Jenkins, Ben Orsburn. In silico approach to accelerate the development of mass spectrometry-based proteomics methods for detection of viral proteins: Application to COVID-19. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383>.
- 4) Ofir Schuster. *et al.*, Specific and Rapid SARS-CoV-2 Identification Based on LC-MS/MS Analysis. *ACS Omega*. 2021 Jan 26;6(5):3525-3534.
- 5) Andreas Hober. *et al.*, Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 infection using quantitative peptide enrichment LC-MS analysis. *Elife*. 2021 Nov 8;10:e70843.
- 6) COVID-19 を理解する : LC-MS に基づく SARS-CoV-2 検出のためのマルチプルリアクションモニタリングのトランジション選択および最適化戦略, Waters アプリケーションノート, 2020. 8.
- 7) COVID-19 を理解する : マルチプルリアクションモニタリングに基づく SARS-CoV-2 分析のために LC-MS 検出のダイナミックレンジの最大化, Waters アプリケーションノート, 2020. 8.
- 8) Praveen Singh. *et al.*, A rapid and sensitive method to detect SARS-CoV-2 virus using targeted-mass spectrometry. *J Proteins Proteom*. 2020;11(3):159-165.
- 9) Christian Ihling. *et al.*, Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients. *J Proteome Res*. 2020 Nov 6;19(11):4389-4392.
- 10) Daniel F Gudbjartsson. *et al.*, Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population., *N Engl J Med*. 2020 Jun 11;382(24):2302-2315.
- 11) Bernard La Scola. *et al.*, Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jun;39(6):1059-1061.
- 12) Anika Singanayagam. *et al.*, Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020., *Euro Surveill*. 2020 Aug;25(32) : 2001483.
- 13) Bullard J, *et al.* Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020 Dec 17;71(10):2663-2666.
- 14) Gniazdowski V, *et al.* Repeat COVID-19 molecular testing: correlation of SARS-CoV-2 culture with molecular assays and cycle thresholds. *Clin Infect Dis*. 2020 Oct 27.
- 15) Junna Oba, *et al.* RT-PCR Screening Tests for SARS-CoV-2 with Saliva Samples in Asymptomatic People: Strategy to Maintain Social and Economic Activities while Reducing the Risk of Spreading the Virus. *Keio J Med*. 2021 Mar 19.

Evaluation of a novel SARS-CoV-2 detection method based on *in silico* prediction and LC–MS analysis

Kazunari TSUJIMURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

Targeted proteomics, which involves the detection of specific peptides using *in silico* prediction and LC–MS analysis, has recently been proposed as a complementary method to RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection. To assess the feasibility of this method, we tested 40 nasopharyngeal swab samples, including those from positive patients for SARS-CoV-2 infection, using RT-qPCR for viral RNA and high-performance liquid chromatography-mass spectrometer (LC–MS), which is commonly used at Public Health Institutes of Japan, for viral protein-derived peptides. The nucleocapsid protein (NCAP) and Spike protein were selected as the viral proteins of interest for targeted proteomic analysis. SARS-CoV-2-specific peptides were detected in 22 specimens with Ct values of 23.54 or less, which is consistent with the RT-qPCR results. The correlation study between “log₂_SumAreas” values obtained from LC–MS analysis of clinical specimens stored in different solutions and Ct values obtained from RT-qPCR revealed a strong negative correlation for specimens stored in virus transport solution ($r = -0.821$) and for those in saline or Phosphate-Buffered Saline (PBS, $r = -0.863$). LC–MS analysis also detected the D377Y mutation of NCAP in the Delta strain. Although the sensitivity of the technique needs to be improved for future applications in negativity testing, it is expected to be one of the complementary techniques to RT-qPCR for directly targeting viral proteins. The technique may also be applicable to other viruses besides SARS-CoV-2.

Key words: *in silico* analysis, Targeted proteomics, LC-MS, SARS-CoV-2, RT-qPCR, COVID-19