

6. 新型コロナウイルス感染者のウイルス排出量の調査及び 分離ウイルス株の遺伝学的解析

○若月 章 (宇都宮市衛生環境試験所)

【研究目的】

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の診断法として PCR 検査が主流となっているが、この感染症のリスクを正しく評価するためには、患者検体中のウイルスの感染性の有無を証明することが必要である。そこで、本研究では検体中の遺伝子量 (Ct 値) と感染性ウイルス量を比較し、PCR 陽性者が他の人に感染させるリスクを評価するための基礎的データを収集した。また、宇都宮市で分離した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の抗原性や遺伝子を解析し国内外で流行しているものと比較した。

【研究の必要性】

当所では 2020 年 3 月～10 月の期間に、SARS-CoV-2 陽性となった有症者及び無症状病原体保有者の鼻咽頭ぬぐい液中の感染性ウイルス量を調査し、その結果について報告した¹⁾。2021 年 4 月以降、海外由来の B.1.1.7 系統の変異株 (アルファ株) や B.1.617.2 系統の変異株 (デルタ株) などの感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株が本市で確認されたため、これら変異株についても感染性ウイルス量を推定できる基礎的データの収集が必要と考えられる。また、ウイルスのスパイク蛋白の変異による抗原性の変化はワクチン効果を低下させる恐れがあるため、中和試験による抗原性解析も必要である。

【研究計画】

(1) 宇都宮市における COVID-19 の発生状況 (2020 年 2 月～2021 年 8 月)

宇都宮市内における COVID-19 の流行状況を把握するために、当所で SARS-CoV-2 の遺伝子が検出された発症日等の疫学情報が明確な検体について、国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター又は当所でゲノム解析をし、Pango 系統を確定した。

(2) 検体中の感染性ウイルス量の測定

Pango 系統が確定できた検体について、SARS-CoV-2 の感染効率が低いとされる VeroE6/TMPRSS2 細胞を 48 穴プレートに単層培養し、輸送培地にて 10 倍階段希釈した検体を 1 希釈につき 0.1mL ずつ 2 穴に接種し、34℃で 7 日間培養後、細胞変性効果 (CPE) を指標に、検体中のウイルス量を TCID₅₀ 法で算出した。さらにこれらの検体について、患者の症状の有無、病日 (発症から検体採取日までの経過日数)、陽性者と接触してからの日数、Ct 値 (タカラバイオ社の SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit) を集計した。

(3) 中和試験による SARS-CoV-2 分離株の抗原性解析

感染した Pango 系統を確定できた COVID-19 患者血清及び SARS-CoV-2 分離株を用いた中和試験により中和抗体価を測定した。

【実施内容・結果】

(1) 宇都宮市における COVID-19 の検査状況 (2020 年 2 月～2021 年 8 月)

図 1 に当所で実施した COVID-19 の検査件数 (人) 及び陽性率を示した。検査を開始した 2020 年 2 月から 2021 年 7 月までに 4 回の流行の波が見られ、第 3 波が最大の流行 (陽性率 9.8%) となった。8 月は 5 回目の流行が始まっている状況であった。

図 2 及び 3 に SARS-CoV-2 のゲノム解析状況 (Pango 系統) を示した。2020 年 3～5 月は欧州系統 (B. 1. 1. 114) 単独の流行、2020 年 6～12 月は国内主流 2 系統といわれている B. 1. 1. 284 と B. 1. 1. 214 との混合流行であったが、2021 年 1 月にスパイク蛋白に E484K 変異を有する R. 1 が確認されて以降、4～5 月には感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される B. 1. 1. 7 及び B. 1. 617. 2 といった海外からの変異株の流入が認められ、流行の波とほぼ一致するように新しい株への置き換わりが進んだ。

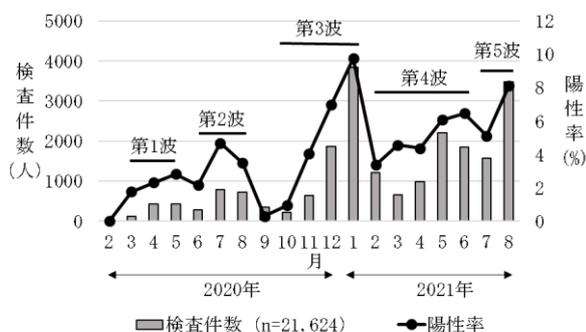


図1. 宇都宮市におけるCOVID-19の検査状況

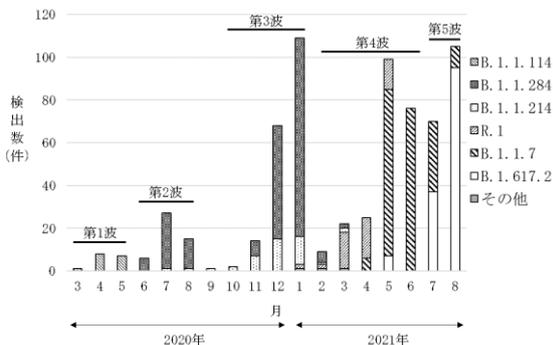


図2. 新型コロナウイルス月別ゲノム解析状況 (各系統の検出数)

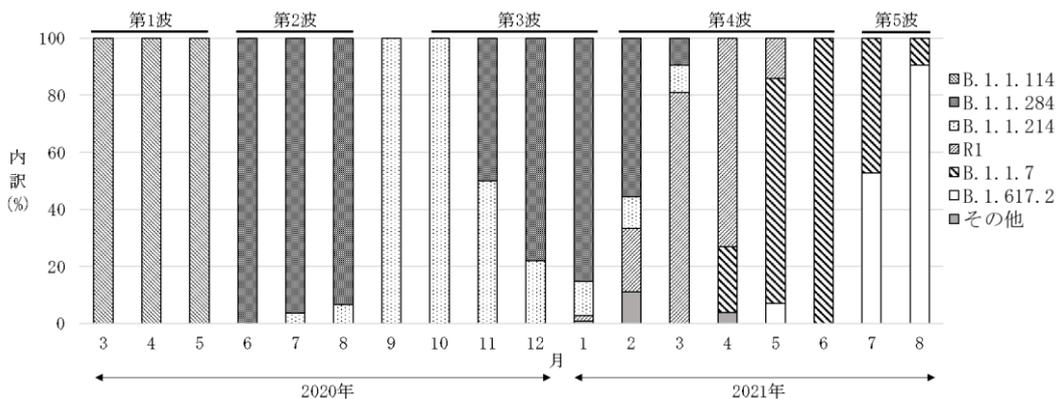


図3. 新型コロナウイルス月別ゲノム解析状況 (各系統の内訳)

(2) 検体中の感染性ウイルス量の測定

SARS-CoV-2 遺伝子陽性となった鼻咽頭ぬぐい液及び唾液を Ct 値ごとに 4 群に分け、ウイルス分離率及びウイルス感染価の幾何平均値を比較した。表 1 に示したように、鼻咽頭ぬぐい液での分離率は、B. 1. 1. 114、B. 1. 1. 284、B. 1. 1. 214 及び R. 1 系統 (以下、従来型) は Ct 値 30 以下では 70%以上、Ct 値 30～35 では分離されず、B. 1. 1. 7 株は Ct 値 25 以下では 100%、Ct 値 25～30 で 16.7%と著しく低下したが、B. 1. 617. 2 株は Ct 値 35 以下の全ての

検体から分離された。唾液での分離率は、いずれの系統も Ct 値 20 以下では 100%であったが、鼻咽頭ぬぐい液と異なり Ct 値 20~25 の群を境に分離率の低下を認めた。

また、図 4 及び 5 に示したように、鼻咽頭ぬぐい液及び唾液中のウイルス感染価は各系統とも Ct 値が大きい（コピー数が低い）程低下した。また、B. 1. 617. 2 株のウイルス感染価は、同じ Ct 値群でも従来型や B. 1. 1. 7 株と比較して高かった。

表 1. Pango 系統ごとのウイルス分離率 (%)

検体	Pango 系統	Ct 値			
		~20	20~25	25~30	30~35
鼻咽頭 ぬぐい液	従来型 ¹⁾	100% (53/53)	96.2% (51/53)	70.4% (19/27)	0% (0/10)
	B. 1. 1. 7	100% (4/4)	100% (6/6)	16.7% (1/6)	0% (0/1)
	B. 1. 617. 2	100% (8/8)	100% (6/6)	100% (2/2)	100% (2/2)
唾液	従来型 ²⁾	100% (6/6)	50.0% (2/4)	50.0% (4/8)	-
	B. 1. 1. 7	100% (3/3)	37.5% (3/8)	9.5% (2/21)	-
	B. 1. 617. 2	100% (3/3)	61.5% (8/13)	42.9% (9/21)	-

1) B. 1. 1. 114 ; 11 検体、 B. 1. 1. 284 ; 98 検体、 B. 1. 1. 214 ; 19 検体、 R. 1 ; 15 検体

2) B. 1. 1. 284 ; 11 検体、 B. 1. 1. 214 ; 3 検体、 R. 1 ; 4 検体

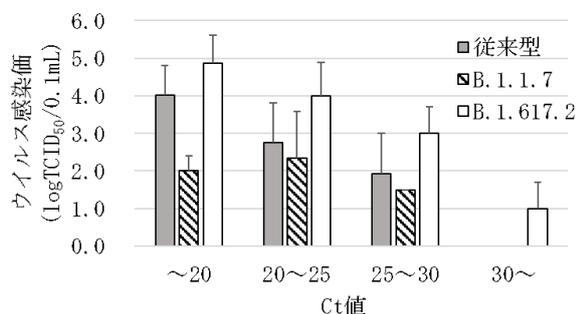


図4. 鼻咽頭ぬぐい液中のSARS-CoV-2

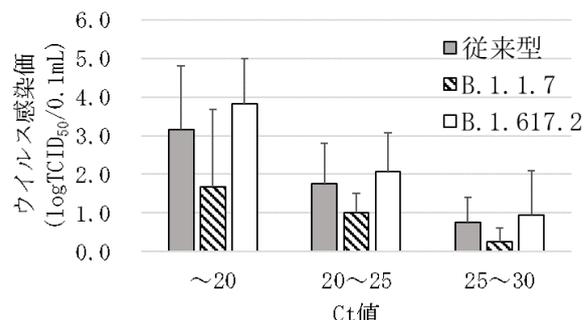


図5. 唾液中のSARS-CoV-2

(3) 有症者のウイルス排出量の調査

図 6 に示すように、有症者の鼻咽頭ぬぐい液 0.1mL 中の感染性ウイルス量は第 0 病日から認められ、第 8 病日までに減少し第 9 病日以降は検出されなかった。

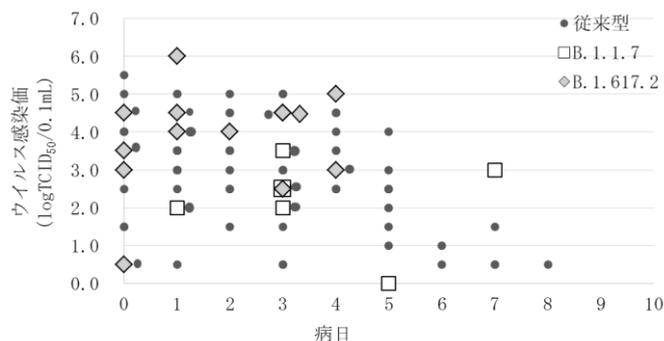


図6. 発病後経過日数とウイルス排出量
(鼻咽頭ぬぐい液中のSARS-CoV-2)

(4) 無症状病原体保有者のウイルス排出量の調査

図7及び8に示すように、濃厚接触者として患者と接触した日が明らかな無症状病原体保有者では、鼻咽頭ぬぐい液中から接触後3~9日間、唾液中から接触後2~6日間、ウイルスの排出を認めた。また、B.1.617.2株は接触後から同じ日数であっても従来型やB.1.1.7株と比較して、唾液中に多くのウイルス排出を認めた。

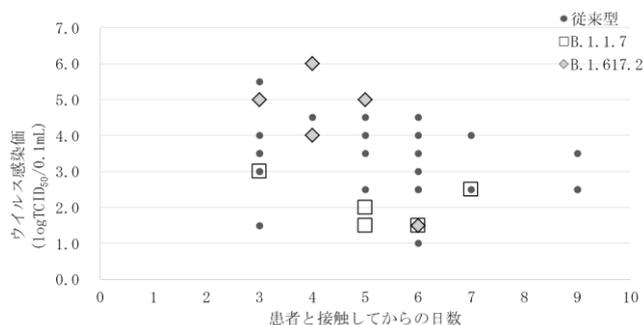


図7. 無症状病原体保有者のウイルス排出量
(鼻咽頭ぬぐい液中のSARS-CoV-2)

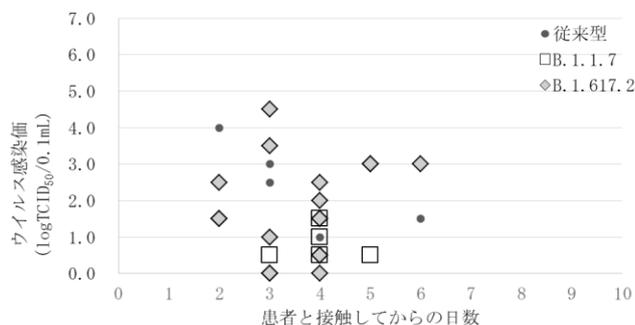


図8. 無症状病原体保有者のウイルス排出量
(唾液中のSARS-CoV-2)

(5) 中和試験による SARS-CoV-2 分離株の抗原性解析

表2に国内で確認されている Pango 系統に感染した COVID-19 患者血清中の各 SARS-CoV-2 分離株に対する中和抗体価を示した。主要な中和抗体の標的部位であるスパイク蛋白の宿主レセプター結合部位に特徴的な変異を認めない従来型(武漢、B.1.1.114、B.1.1.284、B.1.1.214)に感染した No.1~4 の患者血清中の抗体は、従来型の株に対して高い交差性を示したのに対し、R.1(E484K 変異)、B.1.1.7 (N501Y 変異)、B.1.617.2 (L452R 変異) の株に対しては交差性の低下を認めた。また、B.1.1.7 株に感染した No.5 の患者血清中の抗体は、R.1 及び B.1.617.2 株に対して全く交差性を示さなかった。

表 2. 中和試験による SARS-CoV-2 の抗原性解析

		患者血清 No. (感染した SARS-CoV-2 の系統)					
株名	系統	No. 1 (武漢)	No. 2 (B. 1. 1. 114)	No. 3 (B. 1. 1. 284)	No. 4 (B. 1. 1. 214)	No. 5 (B. 1. 1. 7)	
ウ	K105	B. 1. 1. 114	80 ¹⁾	320	160	320	80
イ	L652	B. 1. 1. 284	40	160	160	640	80
ル	M243	B. 1. 1. 214	80	160	80	640	80
ス	Y437	R. 1	10	20	10	20	<10
	H12	B. 1. 1. 7	20	20	20	80	40
	H120	B. 1. 617. 2	<10	<10	<10	10	<10

1) 中和抗体価 (倍)

【考察と今後の課題】

SARS-CoV-2 陽性者が感染源となるか否かは、PCR 検査のみでなく感染性ウイルスの存在を確認することが重要であると指摘されてきた。本研究では、五十嵐らの報告²⁾と同様に Ct 値 30 未満の検体からウイルスが分離され、30 以上ではほとんど感染性ウイルスを検出

できなかつたことから、Ct 値が 30 以上であれば他のヒトに感染させる可能性は低いと考えられた。ただし、一部の Ct 値 30 以上の検体から B. 1. 617. 2 株（デルタ株）が検出され、また、デルタ株のウイルス感染価は同じ Ct 値群でも従来型や B. 1. 1. 7 株（アルファ株）と比較して高かつたことから、デルタ株の感染源としてのリスクは従来株よりも高いと考えられた。本園らはデルタ株が有する L452R 変異は、ウイルスの膜融合活性を高めることでウイルスの感染性を高め、ウイルス複製を促進している可能性があるとしていることから³⁾、デルタ株は従来株と同じウイルス量（Ct 値）でも感染性ウイルスを多く複製している可能性がある。

現在の感染症法での COVID-19 患者の退院基準は、PCR による陰性確認を行わない場合、有症者は発症日から 10 日間、無症状病原体保有者は検体採取日から 10 日間経過することとなっている⁴⁾。本研究での感染性ウイルスの排出期間は、有症者では第 0～8 病日、無症状病原体保有者では患者と接触した日から最長で 9 日間であったことから、現行の退院基準と矛盾しないデータと考えられた。しかし、デルタ株は従来株と比較して、無症状者でも唾液中に多くの感染性ウイルスが検出されたことから、会話や食事による飛沫感染のリスクが高いと言える。また、デルタ株は従来株で誘導された中和抗体に抵抗性を示したことから、感染力が増強しているだけでなく、再感染リスクも高いと考えられた。

現在、海外では次々と新たな変異株が確認されており、また、国内でもワクチン接種が進むことで免疫逃避するような感染力の増加や抗原性の変化した変異株が出現する可能性があることから、引き続きゲノム解析だけでなく、COVID-19 患者検体中の感染性ウイルス量の調査や分離株の抗原性解析を継続していく必要がある。

【参考文献】

- 1) 若月ら, IASR 42: 35-36, 2021
- 2) 五十嵐ら, IASR 42: 84-86, 2021
- 3) Motozono C, *et al.*, Cell Host & Microbe, 29, 1124-1136, 2021.
- 4) 厚生労働省「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における新型コロナウイルス感染症患者の退院及び就業制限の取扱いについて（一部改正）」（令和 3 年 2 月 25 日健感発 0225 第 1 号）

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（細胞・ウイルス培養容器、検体保管用容器）	70,499 円
消耗品費（培地、試薬）	141,262 円
消耗品費（ゲノム解析用マグナスタンド）	87,120 円
雑費（振込手数料）	550 円
合 計	299,431 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円