

諫早湾干拓調整池におけるイケチョウガイの成長・生残に関わる波浪軽減施設の効果

粕谷智之・豊村 誠・橋本京太郎・前田祐加¹・本多洋幸²

1(現所属)長崎県県民生活環境部地域環境課, 2(現所属)長崎県五島保健所

諫早湾干拓調整池において、二枚貝の成長および生残の制限要因と考えられる波浪に対する対策の効果を検証するために、目合い 16 mm のネットを、水平および垂直に張った2通りの波浪軽減施設を設置し、施設の中央付近で地播き飼育したイケチョウガイの成長および生残状況を調査した。流向流速計を用いて波浪軽減施設内と対照区の流速を測定した結果、波浪軽減施設の流速は台風通過時などでも対照区の流速の概ね半分程度に抑えられており、波浪軽減効果が確認された。波浪軽減施設での飼育は、台風などが襲来する夏期において、イケチョウガイの殻長の増加に効果が見られた。一方で、秋期において成長速度が対照区よりも低下するマイナス効果も見られたことから、波浪対策は時期に応じて施すことが重要と考えられる。

キーワード: イシガイ類、淡水真珠、養殖、水質浄化

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」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)}。

近年、大型の淡水二枚貝であるイケチョウガイ(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⁾。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⁵⁾。しかし、調整池は創造された水域であることから二枚貝の生息量が極めて少ない⁶⁾。イケチョウガイは大型化(最大 20~30 cm)することから高い水質浄化能力を持つと考えられるうえに、淡水真珠の母貝であることから真珠生産も可能である。そこで、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^{7, 8, 9)}。

これまでに行った研究により、調整池では、養殖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・成長することが明らかとなった⁷⁾。一方で、水深が 40 cm ほどの浅い水域における地播き飼育では、夏期において、高水温のスト

レスに加えて波浪による殻体が損傷するストレスを受けることから、生残率が低く、現状では成育できる水域が限定されることが明らかとなった⁹⁾。地播き飼育は養殖カゴなどが不要であり、維持管理に掛かる手間が少なく、大量飼育に適していると考えられることから、調整池でイケチョウガイを始めとする二枚貝を飼育するためには、波浪による殻体の掘り起しなどを軽減する対策が必要である。

二枚貝の地播き養殖に係る波浪軽減策については、海洋性二枚貝のアサリを対象として、干潟においてノリ養殖支柱柵を用いた実験事例が報告されている¹⁰⁾。本研究では、アサリ養殖で取り入れられている波浪対策を参考にした波浪軽減施設を、調整池ヨシ進出工の内外に設置し、その中でイケチョウガイを飼育することによって効果などを検討した。

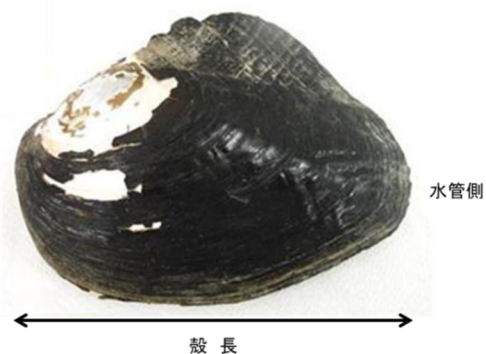


図1 イケチョウガイ外観(殻長 20 cm)

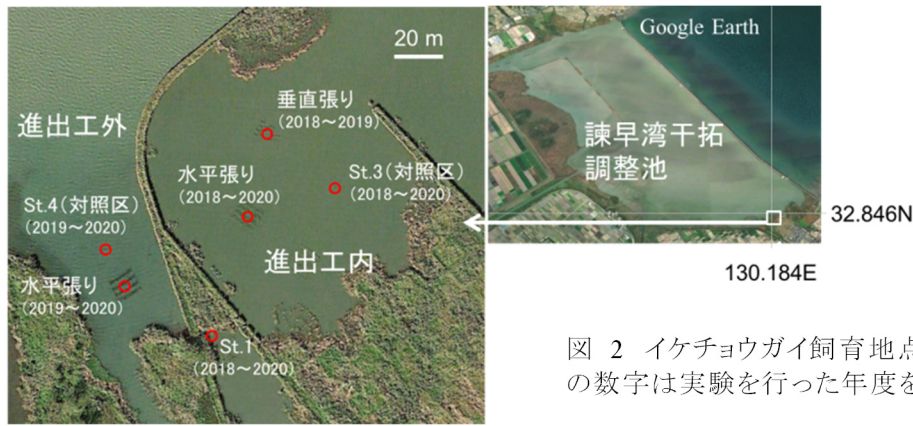


図 2 イケチョウガイ飼育地点の位置図。カッコ内の数字は実験を行った年度を表す。

材 料 と 方 法

1 飼育実験

飼育実験は調整池のヨシ進出促進工（以降、進出工）内4地点、進出工外2地点で行った（図2）。St.1は周囲をヨシで囲まれていることから、対策を施さなくても波浪が軽減されていると考えられる地点⁹⁾、St.3および St.4は対照区である。進出工内は水深40 cm程度で泥質、進出工外は水深 60 cm程度で砂泥質である。進出工内では波浪軽減対策の季節的な効果を検討し、進出工外では1年半の連続飼育によって長期間の効果を検討した。

波浪軽減施設は、アサリ養殖で用いられている施設を参考にして¹⁰⁾、目合い16 mm のネットを垂直に設置した「垂直張り」と、水平に設置した「水平張り」の2種類を用いた（図3）。アサリ養殖では、ネットに海藻が付着することによって波浪軽減効果が高まること報告されている¹⁰⁾。淡水域の調整池では藻類は

それほど付着しないと考えられることから、代替としてネットにカーボン繊維（ソーエン製ミラカーボンCFK-1）を取り付けた（図3）。調整池では夏には南西の風、秋には北東の風が優占する¹¹⁾。そこで、垂直張りでは、ネット面が風向に対して直角、すなわち、南東方向となるように設置した。同様に水平張りでは、ネット長辺が南東となるように設置した。

飼育実験には、殻長95～157 mm のイケチョウガイ（2～5年貝）、153個体を使用した。進出工内の飼育では、年度ごとに滋賀県真珠養殖漁業協同組合および齋木産業株式会社から購入した2年貝を主に使用した。進出工外での飼育には、進出工内で飼育実験に用いた後、同水域で畜養した3～5年貝を用いた。すべての個体には、殻の上部に開けた穴に番号札をつけたナイロン釣糸（10号）を結びつけた。釣糸の片端を太さ 4 mm のクレモナロープに結び付け、さらにクレモナロープを支柱に繋ぐことによって殻体の流失を防ぐとともに、個体ごとに成長を管理した（図4）。支柱1本当たりのイケチョウガイ数は5個体とした。各地点（波浪軽減施設では中央付近）の底面に、イケチョウガイを繋いだ支柱を、間隔を開けて複数本差し込んだ後、イケチョウガイを底質中

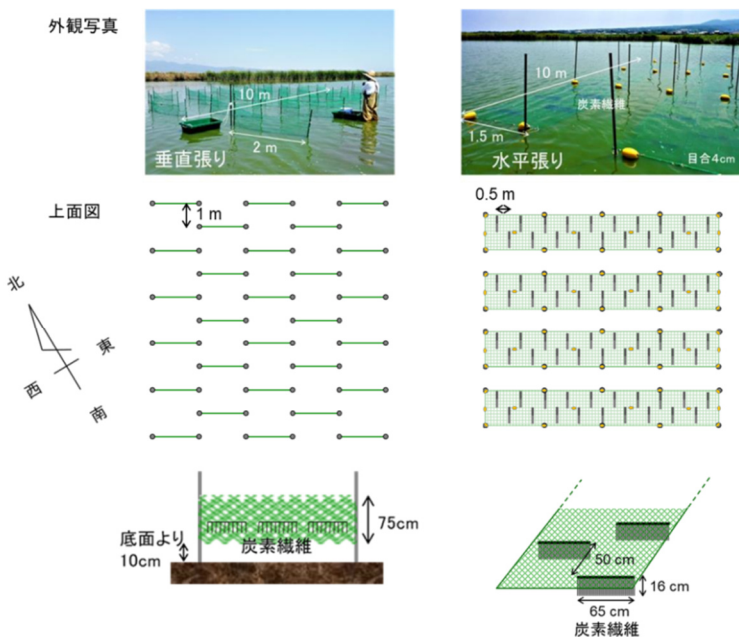


図 3 波浪軽減施設（左：垂直張り、右：水平張り）の概要

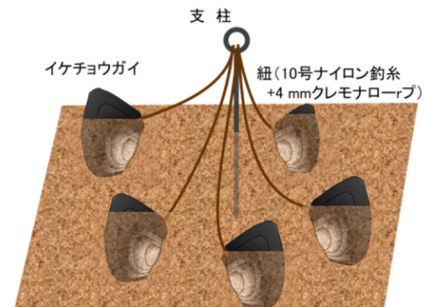


図 4 イケチョウガイ地播き飼育方法の概要。波浪軽減施設ではイケチョウガイは施設中央付近で飼育した。

に水管(図1, 4)を上向きにして殻体の半分ほど埋め込んだ。

2 イケチョウガイの生残確認と殻長の計測

イケチョウガイの生残確認と殻長の測定は、貝が成長する春から秋までの期間として、原則1ヶ月に1回の頻度で行った。底質からイケチョウガイを掘り起こして生残を確認した後、殻長を計測した(図1)。計測を終えた個体は、再度、底質中に埋め戻した。水深のある進出工外での飼育では、イケチョウガイを掘り起こす際に紐が切れて回収できなくなる可能性があることから、生残確認は、紐を軽く引っ張った際に引き抜けることなく、殻体が底質中に埋まっていることが確認された個体を生残とした。また、殻長の計測は実験開始時と終了時の2回のみとした。

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

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

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

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。

3 環境項目の測定

イケチョウガイの生残に大きく影響すると考えられる7月～9月の水温⁹⁾については、水位計(HOBO社製 U20および U20L)の水温センサーを St.3の底

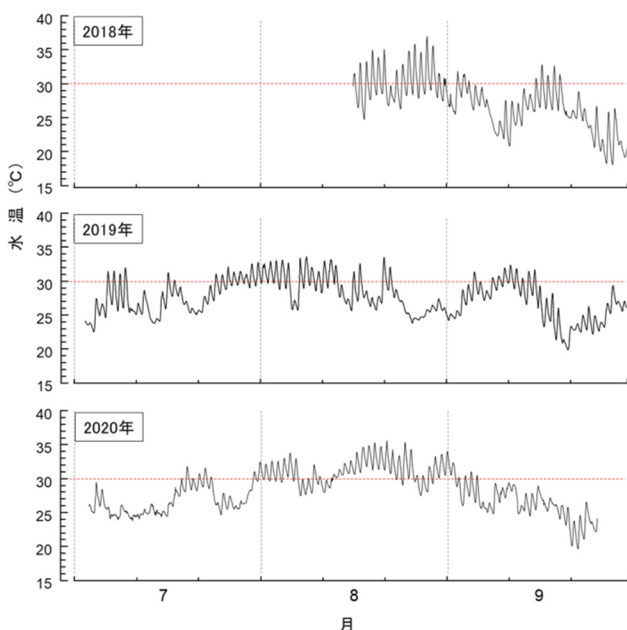


図5 進出工内の St.3(対照区)における夏期の水温の推移。赤い実線は水温 30 を表す。

面直上に設置して、10分から15分間隔で連続的に観測した。

波浪軽減効果を検討する際の指標となる流速については、小型メモリー流速計(JFE アドバンテック製 INFINITY-EM)を、センサー部分が底面から10 cm 上となるように設置して120分間隔で5分間(0.5秒間隔で600サンプル)計測した。

溶存酸素量については、進出工内では、これまでの調査から夏期の夜間は貧酸素状態となるものの、昼間は過飽和状態となり、イケチョウガイの生残に水温ほど影響していないと考えられることから⁹⁾、測定項目から除外した。また、イケチョウガイの餌である植物プランクトンの量の指標となるクロロフィル *a* については、調整池では餌量は十分と考えられることから⁹⁾、同様に除外した。

結果

1 飼育環境

(1) 水温

各年の7月～9月における水温変動を図5に示す。7月の水温は概ね25 から30 の範囲であったが、8月に入ると水温30 を超える日が多くなり、2018年8月の最高水温は36.7 に達した。また、2020年8月中旬には、およそ12日間に渡って夜間でも水温30 以上となった。9月に入ると水温は30 以下となることが多くなり、20 から30 の間で推移した。

(2) 流速

進出工内の波浪軽減施設と対照区の流速プロットを図6に示す。2018年度は流速の最大値は対照区である St.3では 4.1 cm/秒であったのに対して、軽減施設では 2.1 cm/秒であった。同様に、2019年度および2020年度の流速の最大値は、対照区でそれぞれ 8.1 cm/秒および 10.6 cm/秒であったのに対して、軽減施設では 8.2 cm/秒および 6.6 cm/秒であった。両者の関係に回帰直線を当てはめた結果、傾きの範囲は0.29～0.41であり(図6)、波浪軽減施設の方が対照区よりも流速が低下した。回帰直線の傾きは、2019年度は水平張り(0.29)で垂直張り(0.35)よりも低くなったものの、2018年度は水平張り、垂直張りとも傾きは0.41であり、違いは見られなかった。

2 飼育実験結果

(1) 生残

飼育実験におけるイケチョウガイの生残率の推移を図7に示す。進出工内では、生残率は対照区であ

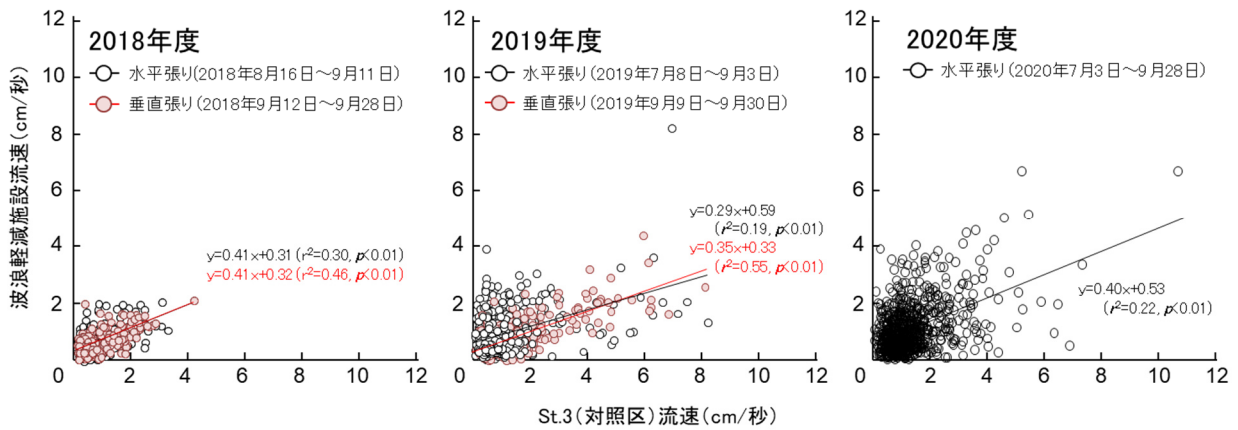


図 6 進出工内における波浪軽減施設と St.3 (対照区) の流速プロット。図中の実線は回帰直線を表す。

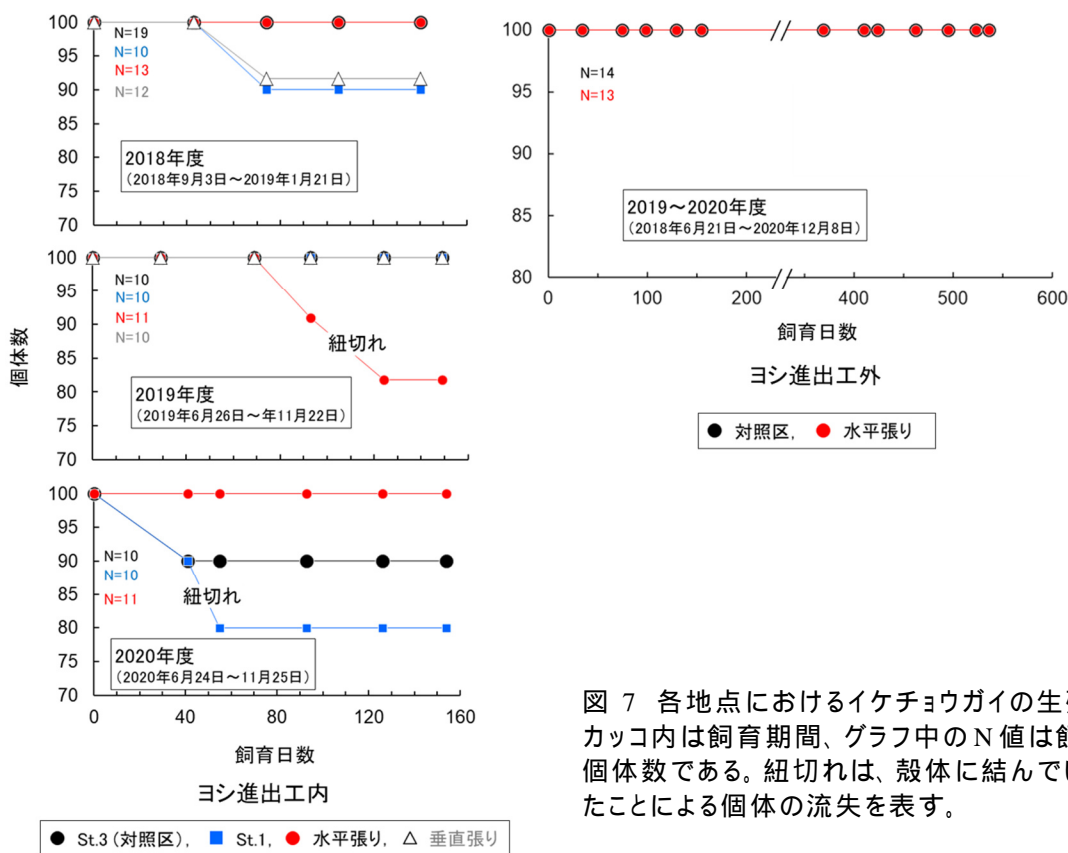


図 7 各地点におけるイケチヨウガイの生残率の推移。カッコ内は飼育期間、グラフ中の N 値は飼育開始時の個体数である。紐切れは、殻体に結んでいた紐が切れたことによる個体の流失を表す。

る St.3 で 90 ~ 100%、St.1 で 80 ~ 100%、水平張りで 80 ~ 100%、垂直張りで 90 ~ 100% であった。水平張りおよび垂直張りでは、紐切れによる個体の流失を除けば生残率は 90 ~ 100% であり、地点間で差は見られなかった。また、進出工外における飼育実験では、対照区である St.4 および水平張りともに生残率は 100% であり、違いは見られなかった。

(2) 成長

各地点間におけるイケチヨウガイの瞬間成長速度を図 8 に示す。2018 年度は 9 月 3 日 ~ 10 月 16 日の垂直張りにおいて、瞬間成長速度は対照区よりも有意

に低かった (t -検定、 $p < 0.05$)。

2019 年度は、県下では 9 月 22 日に台風 17 号接近に伴う暴風雨により大きな被害が発生した。このイベントが含まれる 9 月 3 日 ~ 9 月 27 日の瞬間成長速度は、St.1 と水平張りにおいて対照区よりも有意に高かった (t -検定、 $p < 0.05$)。しかし、9 月 27 日 ~ 10 月 28 日の期間においては、St.1 と水平張りの瞬間成長速度は、対照区よりも低く、有意な差があった (t -検定、 $p < 0.05$)。これらの結果から、波浪軽減効果は水平張りのほうが垂直張りよりも高いと想定されたことから、2020 年度の飼育実験は、St.1 と水平張りに絞って再

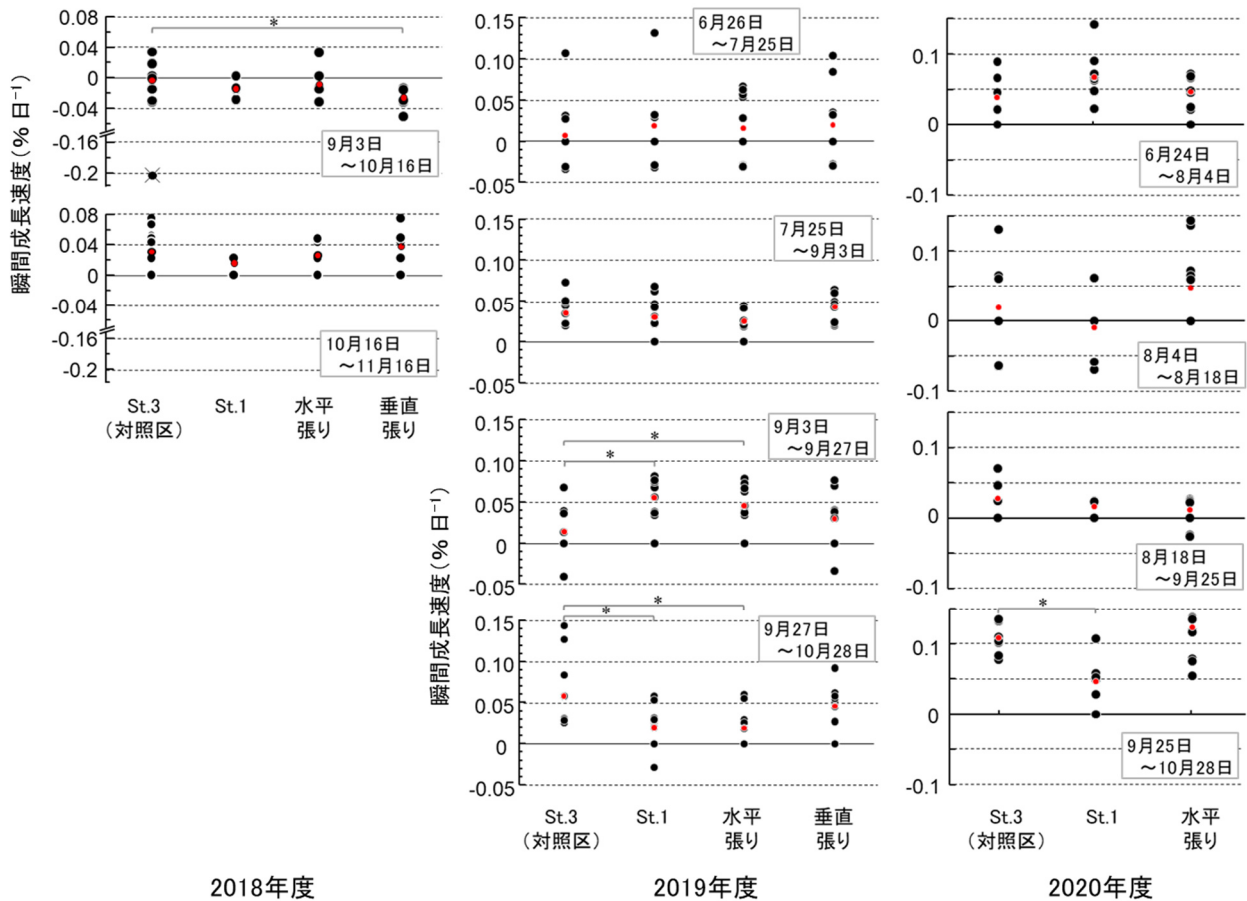


図 8 進出工内におけるイケチョウガイの瞬間成長速度の地点間比較。赤丸は平均値、*は有意水準 ($p < 0.05$) を表す。グラフ中の 枠内は飼育期間である。

現性の確認を行った。

2020年度は7月6日に豪雨災害(令和2年7月豪雨)が発生し、また、9月6日から7日にかけて、台風10号の通過により大きな被害が生じた。これらの影響により、波浪軽減施設は破損しては修繕の繰り返しとなったことから(図9)、評価が困難となった。しかし、ヨシに囲まれることによって、波浪軽減施設と同様の効果があると思われる St.1では、瞬間成長速度は2019年と同様に9月25日～10月28日の期間においては対照区より有意に低かった(t -検定、 $p < 0.05$)。



図 9 2020年7月6日に発生した豪雨災害後、7月22日の進出工内の波浪軽減施設(水平張り)の状況

進出工外においては、水平張りの波浪軽減施設下で、およそ一年半に渡り同一個体を継続して飼育した。水平張りの瞬間成長速度は対照区よりも高く(図10)、有意な差が見られた(t -検定、 $p < 0.05$)。

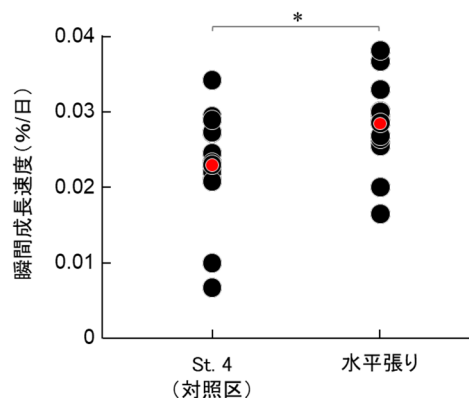


図 10 進出工外における St.4(対照区)および水平張り波浪軽減施設の瞬間成長速度の比較。瞬間成長速度は実験開始時(2019年6月21日)と終了時(2020年12月8日)の殻長から計算した。赤丸は平均値、*は有意水準 ($p < 0.05$) を表す。

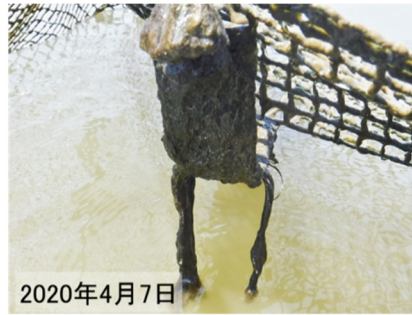
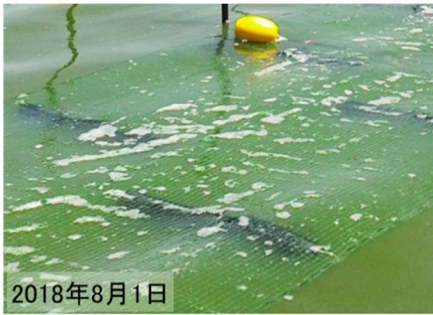


図 11 波浪軽減施設(水平張り)に用いたカーボン繊維の状況。2018年8月は水中でカーボン繊維(長さ16cm)が広がっているのが確認できる。2020年4月には、繊維がほとんど抜けてしまっている。

考 察

1 波浪軽減対策の流速に対する効果

波浪軽減施設と対照区との流速プロットから得られた回帰直線の傾きは0.29～0.41であり(図6)、波浪軽減対策によって、流速を3割から4割まで下げることが可能であることが明らかとなった。県下で台風による被害が生じた2019年度では、回帰直線の傾きは他年度よりも低く、2018年度では殆ど記録されなかった、流速が4cm/秒を超える条件下で高い効果が得られると考えられる。

一方で、2019年度と同様に流速4cm/s以上のデータが多数記録された2020年度では、回帰直線の傾きは0.40であり、2019年度のような軽減効果は得られなかった。豪雨災害による施設損壊に加えて、取り付けたカーボン繊維が使用にともなう劣化などで抜け落ちたことによって(図11)、波浪軽減能力が低下した可能性が考えられる。

2 波浪軽減対策のイケチョウガイの生残および成長に対する効果

粕谷ら⁹⁾が2016年に行った進出工内でのイケチョウガイ地播き飼育では、7月～9月にかけて多数のイケチョウガイが斃死し、この期間の生残率はSt.1で85%であったのに対して、St.3では40%であった。粕谷ら⁹⁾は、イケチョウガイの死亡原因として、高水温による個体の疲弊に加えて、波浪による掘り起しによる殻体の損傷ストレスを挙げている。対して、本研究におけるイケチョウガイの生残率は波浪軽減施設および対照区ともに80～100%と、粕谷ら⁹⁾の結果と比較して高い結果となった。2016年夏期の進出工内では、水温30以上の状態がおよそ1カ月間に渡って続いていた⁹⁾のに対して、本研究では2020年8月に記録された12日間である。イケチョウガイの適性水温は20～25である¹²⁾。また、殻長約4cmの稚貝を用いた摂餌実験では、イケチョウガイは水温30.7で摂餌を殆ど停止する¹³⁾。2016年の飼育実

験と比較して、本研究ではイケチョウガイが受けた高水温のストレスは小さかった可能性があり、結果として、高い生残率に繋がったと考えられる。

生残率では波浪軽減対策による差が見られなかったものの、瞬間成長速度では地点間で違いが見られた。2018年9月3日～10月16日の飼育実験では、垂直張りにおける瞬間成長速度は対照区よりも有意に低かった(図8)。また、台風による強風の影響を受けた2019年9月3日～9月27日の飼育実験では、瞬間成長速度はSt.1と水平張りでは対照区よりも有意に高かったのに対して、垂直張りでは対照区と差は見られなかった。このことから、水平張りのほうが垂直張りよりも波浪軽減効果は高いと考えられる。垂直張りは高い波浪軽減効果を得るように、調整池で夏から秋にかけて高頻度で出現する南西および北東の風向¹¹⁾に対して、面が垂直となるように設置していることから、台風などに起因するイレギュラーな波浪に対しては軽減効果が低下する可能性がある。

一方で、2019年9月27日～10月28日の飼育実験では、瞬間成長速度はSt.1および水平張りでは対照区よりも有意に低い結果となった(図8)。また、同様の結果は、2020年9月25日～10月28日の飼育実験でも、St.1から得られた。St.1では周囲をヨシで囲まれることによって、波浪軽減対策と同様の効果があると思われることから⁹⁾、9月下旬以降の瞬間成長速度の低下は、対策のマイナス面を表している可能性がある。

海産二枚貝のアサリは、流速が4cm/秒以上の条件下で良く成長する¹⁴⁾。これは、二枚貝の周辺の水塊が、流速が高ければ摂餌前の餌濃度が高い水塊に短時間で入れ替わる、すなわち、餌供給量が増加するからである。イケチョウガイの生息適正水温は20～25であることから¹²⁾、進出工内におけるイケチョウガイは、水温が適正範囲に近づく9月下旬以降では、活発に摂餌を行うことが推察される。波浪

対策を行った施設や周りをヨシで囲まれている St.1 では、流速が低下することによって餌供給量が対照区よりも低下すると思料され、これが9月下旬～10月にかけて観察された St.1 および水平張りにおける瞬間成長速度の低下に繋がった可能性がある。しかし、進出工外でおよそ1年半に渡り行った飼育実験では、水平張りの瞬間成長速度は対照区よりも高かったことから(図10)、波浪軽減施設は長期的にはイケチョウガイの成長にプラスに働いていると考えられる。

おわりに

イケチョウガイの飼育に用いた波浪軽減対策は、台風などが襲来する夏期において、イケチョウガイの殻長の増加に効果が見られた一方で、秋期において成長が低下するマイナス効果も見られた。秋期の成長速度の低下は、流速低下による餌供給量の減少が一因の可能性のあることから、イケチョウガイの成長促進効果をより高めるためには、時期に応じて波浪対策を施すことが重要と考えられる。

調整池に自生するドブガイは、イケチョウガイと同じイシガイ類であることから、波浪軽減対策はドブガイの成長・生残にも有効と思われる。今後、得られた知見が、在来種の保護増殖に関わる一助となることも期待される。

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) 長崎県：第2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，(2008)。
- 3) 長崎県：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
- 5) 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)。
- 6) 粕谷智之，玉屋千晶：諫早湾干拓調整池の生物相(植物プランクトン及び底生生物)，長崎県環境保健研究センター所報，58，84～86(2012)。
- 7) 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)。
- 8) 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)。
- 9) 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)。
- 10) 水産庁：干潟生産力改善のためのガイドライン，東京，(2008)。
- 11) 農林水産省：諫早湾干拓事業の潮受堤防の排水門の開門に伴う環境変化を把握するための調査(調査結果の概要)，(2015)。
- 12) 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(1)，25～32，日本水産資源保護協会，東京，(1995)。
- 13) 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)。
- 14) 岸岡正伸，柿野 純，井上隆彦，多賀 茂，和西昭仁，白木信彦，山崎康裕，小野里 坦，國森拓也，宮後富博，齋藤秀郎，鹿野陽介：遊休クルマエビ養殖池を活用したアサリの増養殖，山口県水産研究センター研究報告，13，25～45(2016)。

長崎県環境保健研究センター所報 67，(2021) 報文(2009)。

Effect of wave mitigation measures on the growth of a freshwater bivalve
Hyriopsis schlegelii in Isahaya Bay reclamation regulation pond
in Nagasaki Prefecture, Japan

Tomoyuki KASUYA, Makoto TOYOMURA, Kyotaro HASHIMOTO, Yuka MAEDA¹,
Hiroyuki HONDA²

1 Present address: Nagasaki Prefectural Government

2 Present address: Nagasaki Prefectural Goto Health Center

Two measures for mitigation of wave action, using a 16 mm mesh net set horizontally and vertically, were used to investigate the influence on the growth increase and survival of a freshwater bivalve *Hyriopsis schlegelii* culturing in Isahaya Bay Reclamation Regulation Pond from 2018 to 2020. The current velocities, measured using an electromagnetic current meter logger, were almost half in the experimental area with wave mitigation compared to the control area. Additionally, although Nagasaki prefecture was struck by a typhoon on 22 September 2019, the instantaneous growth rate of *H. schlegelii* in the experimental area with the horizontally installed nets was substantially higher than that of control. However, in the experimental area, a substantially low instantaneous growth rate than that of the control area was observed from late September to October 2019. The lower growth observed in the experimental during autumn might be due to a decline in food supply caused by a decrease in current velocity. Therefore, wave mitigation measures should be applied only during the typhoon season, i.e., from July to September.

Key words: unionid mussels, freshwater pearl, aquaculture, water purification

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 (2021年度)

松本 文昭, 高木 由美香, 中峯 文香, 右田 雄二, 蔡 国喜, 川野 みどり,
山口 結奈, 井原 基, 吉川 亮

長崎県では、2020年2月からSARS-CoV-2のreal time PCRによる検査を開始しており、2021年4月1日から2022年3月31日までに延べ22,636検体の検査を行った。また、変異株検出のためのスクリーニングPCRを行うとともに2021年7月からは次世代シーケンサーを用いたゲノム解析体制を整備し、県内流行株の詳細な系統分類を行った。その結果、2021年4月から7月にかけての流行第4波においてはアルファ株B.1.1.7系統が、続く2021年8月から10月にかけての第5波においてはデルタ株AY.29系統が主要な流行株であった。2022年1月から始まった第6波においてはオミクロン株BA.1.1.2系統が多数を占めていたものの、2月頃から新たにBA.2系統が検出され始め、3月末にかけて置き換わりが進んでいった。次世代シーケンサーを活用したサーベイランス体制を継続することにより、新たな変異株による流行の端緒を早期に探知でき、迅速なまん延防止対策に寄与できると考えられた。

キーワード：SARS-CoV-2、新型コロナウイルス感染症、変異株、ゲノム解析

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、世界的なパンデミックとなった。さらに、SARS-CoV-2は変異を繰り返し、感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される変異株 (Variant Of Concern) =VOC) が出現し、WHOを中心として世界的なサーベイランス体制が取られている¹⁾。我が国においても、国立感染症研究所がWHOの評価を参考にいくつかの変異株をVOCに位置付け、発生動向を監視してきたが、2022年4月28日現在、デルタ株とオミクロン株をVOCに位置付けている²⁾。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。初期症状はインフルエンザや感冒と似ているため、発症初期にこれらの疾患と区別するのは困難であることから、抗原検査や遺伝子検査による検査診断が重要となる³⁾。当センターでは既報⁴⁾のとおり2020年2月から行政検査対応を開始しており、ここでは、2021年4月以降の検査結果について報告する。

材料および方法

1 調査期間

2021年4月1日から2022年3月31日

2 供試検体

(1) 陽性者の接触者調査

長崎県内でCOVID-19患者発生に伴う積極的疫学調査の一環として行われた接触者調査において、保健所長が検査を必要とすると判断した者を調査対象とし、調査対象者から採取された鼻咽喉ぬぐい液等の上気道由来検体、喀痰等の下気道由来検体および唾液を検査材料とした。それらの検体は、医療機関や保健所において採取され、保健所職員により当センターに搬入された。そのようにして集められた延べ22,636検体を検査に供した。

(2) 変異株PCR

2020年度から引き続き、アルファ株の特徴であるSpike proteinの501番目のアミノ酸変異(N501Y)を検出する変異株PCRを行うとともに、新たに出現したデルタ株の特徴である452番目のアミノ酸変異(L452R)を検出する検査系を整備した。それらの方法を用いて、県内で陽性となった事例に対し変異株PCRによるスクリーニング

を実施した。当センターにおいて陽性となった検体並びに医療機関において陽性となった検体のうち保健所が必要と認め、検査依頼のあったもの延べ1,074検体を変異株スクリーニング検査に供した。

(3) ゲノム解析

SARS-CoV-2の全塩基配列に基づく変異株の確定検査のため、国立感染症研究所に検体を送付し解析を依頼するとともに、2021年7月からは、当センターにおいても次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer; NGS)によるSARS-CoV-2のゲノム解析を開始した。(1)および(2)の検査においてSARS-CoV-2遺伝子陽性となったもののうち、ゲノム解析に必要と考えられるRNA量 (real time PCRにおいてCt値27以下)が見込まれた1,056検体をゲノム解析に供した。

3 方法

(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。

喀痰検体や唾液検体は、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, Hilden, Germany) 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検査やゲノム解析に供した。

(3) PCR検査

新型コロナウイルス検出マニュアル⁵⁾ に記載されたプライマーおよびプローブを用いて、real time PCR法によるSARS-CoV-2の遺伝子検出を実施した。PCR試薬は、FastVirus 1-step RT-PCR mix (ThermoFisher, Waltham, United States) を用いて検出マニュアルに記載された条件で反応を行い、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。2022年1月からは、

厚生労働省より自治体における新型コロナウイルス検査の支援として配布されたTaqPath SARS-CoV-2検出キット (ThermoFisher)を用いた検査に切り替えた。当該キットを用いた検査では、N protein, ORF1abおよびS protein領域の3か所の遺伝子を増幅し、キット添付文書に基づき37サイクル以内に増幅曲線が認められたものを陽性と判定した。

(4) 変異株PCR

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (TaKaRa, Kusatsu, Japan) に、アルファ株判別用のPrimer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (TaKaRa)またはデルタ株判別用のPrimer/Probe L452R (SARS-CoV-2) Ver.2 (TaKaRa)を組み合わせ、製品添付文書に従って反応を行い、40サイクル以内に増幅曲線が認められたものについて、各検出系におけるWild (野生型 = 陰性)であるか、Mutant (変異株 = 陽性)であるかを判別した。

(5) ゲノム解析

SARS-CoV-2のゲノム解析は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター (以下、感染研ゲノムセンター) が作成したマニュアル⁶⁾ に準拠して反応試薬を調製のうえMiSeq Reagent Micro Kit (Illumina, San Diego, United States)を用いてゲノム解析を行った。すなわちLunaScript RT Super Mix (New England Biolabs: NEB, Ipswich, United States)によりサンプルRNAからcDNAを合成し、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)によりMultiplex PCRを行った。増幅反応後、AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, United States)を用いて精製し、Qubit ds DNA HS Assay Kit (ThermoFisher)により二本鎖DNA濃度を定量した。精製後の増幅産物に対してQIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)による断片化およびアダプター付加を行い、再度AMPure XPによる精製を行ったのち、反応産物を1本のチューブにプールした。そのようにプールした反応産物を0.2 N NaOH (富士フィルム和光純薬)により5分間室温にて変性したのち、MiSeq Reagent Micro Kitに同梱されたHT1 Bufferを用いて10 pMに希釈したものをMiSeqにロードして解析した。その結果得られた解析データは、感染研ゲノムセンターが作成したSARS-CoV-2ゲノム情報解析サイト「COG-JP」にアップロードし、アセンブリとNextClade⁷⁾並びにPangoLineage⁸⁾による系統分類に使用した。

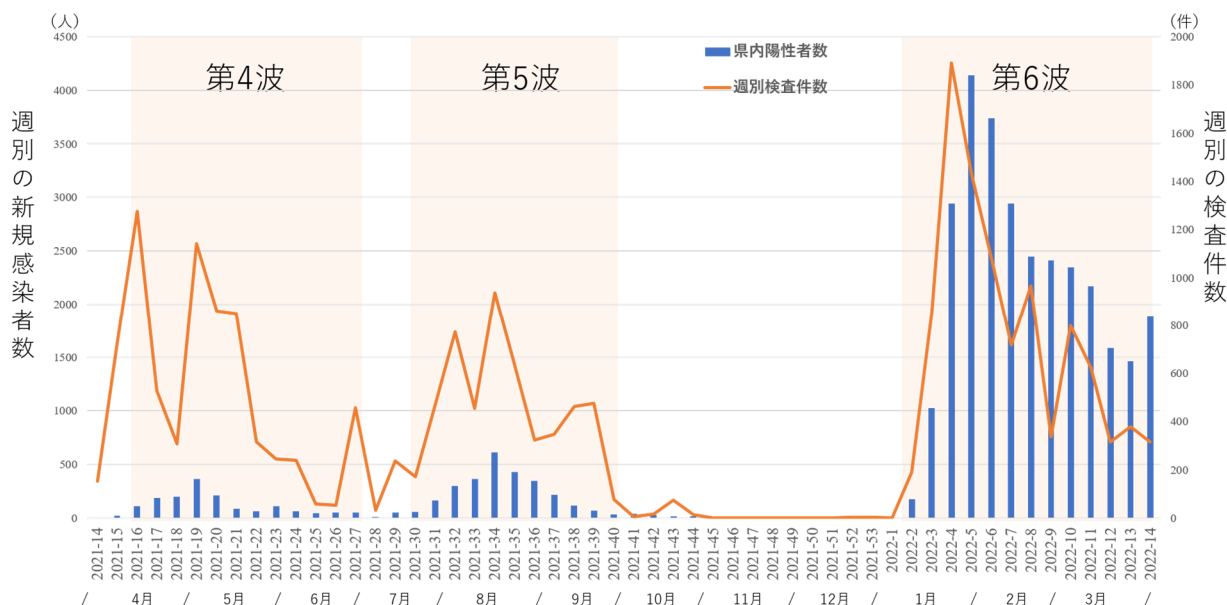


図1 環境保健研究センターにおける週別検査件数と長崎県における週別新規感染者数の推移
 流行波は、長崎県における新型コロナウイルス感染対応段階の目安であるステージ2(感染者の漸増)が発表された時点から解除されるまでを表している。

参考：長崎県新型コロナウイルス感染段階

https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/corona_nagasaki/corona_kansendankai/ (2022.6.23)

結果

1 陽性者の接触者調査

調査期間中に搬入された22,636検体のうち、1,858検体からSARS-CoV-2の遺伝子が検出された。20,773検体からはSARS-CoV-2遺伝子が検出されず、残る5検体はCt値40以上で増幅を疑う反応が認められたが判定保留とした。判定保留検体については、管轄保健所に追加の検体採取と再検査を推奨したが、追加検査依頼はなかった。

2 変異株PCR

変異株PCRに供した1,074検体のうちN501Y変異株PCRに供した258検体を検査した結果、陽性が211検体、陰性が40検体、判定不能(検出限界未満)が7検体であった。L452R変異株PCRに供した892検体のうち陽性が316検体、陰性が532検体、判定不能(検出限界未満)が44検体であった。

3 ゲノム解析

ゲノム解析に供した1,056検体のうち1,021株のSARS-CoV-2ゲノムを決定した。NextCladeによる解

析の結果、アルファ株(20I Alpha, V1)が197株、デルタ株(21J Delta)が283株、オミクロン株(21Kおよび21L)が541株であった。それぞれの変異株のPangoLineageによる系統分類の結果、アルファ株は全てB.1.1.7に分類され、デルタ株はAY.29系統(AY.29.1, AY.29.2を含む)が278株、AY.25系統とAY.3系統がそれぞれ2株、AY.103系統が1株であった。オミクロン株はBA.1系統(BA.1, BA.1.1, BA.1.1.1, BA.1.1.2, BA.1.15を含む)が525株、BA.2系統(BA.2, BA.2.10, BA.2.3.1を含む)が16株であった。

考察

調査期間中における週別検査件数の推移と長崎県内で報告された陽性者数の組み合わせグラフを図1に示す。当センターにおける週当たりの検査件数は、2021年4月から始まった第4波においては、流行開始直後の2021年第16週(2021/4/19~4/25)の1,275件/週をピークとして増減を繰り返しながら、2021年第28週(2021/7/12~7/18)に一旦落ち着いた。しかし、流行第5波が2021年第30週

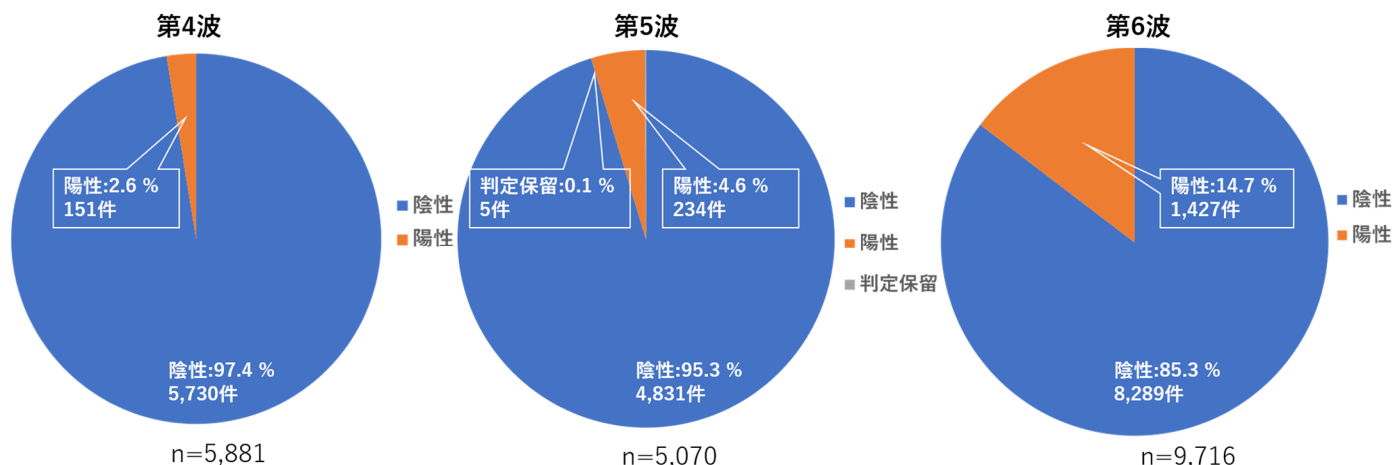


図2 流行の波ごとの検査件数と陽性率

(2021/7/26~8/1)から始まると検査件数が急増し、2021年第34週 (2021/8/23~8/29)には937件/週まで増加した。第5波における検査件数は2021年第34週をピークに、2021年第40週 (2021/10/4~10/10)には78件/週まで減少し、その後しばらく小康状態が続いた。しかし、2022年第2週 (2022/1/10-1/16)からオミクロン株による流行第6波が始まると検査件数は再び急増し、2022年第5週 (2022/1/31~2/6)には、調査期間を通して最大の1,892件/週まで増加した。その後は、クラスター発生に伴う調査による微増はあったものの、検査件数は漸減傾向を示していた。

各流行波における検査件数と陽性率を図2に示す。第4波と第5波では、それぞれ2.6%と4.6%であったが、第6波においては14.7%であり、それまでの流行波における陽性率よりも高かった。第6波の流行株であるオミクロン株は、デルタ株と比較した時に接触者への伝播力が高いことが報告されており⁹⁾、その影響による可能性が考えられた。

ゲノム解析による系統分類並びに流行波ごとの系統別検出数を図3に示す。本県における流行第4波はアルファ株B.1.1.7系統が、第5波はデルタ株AY.29系統が主な流行株と考えられ、全国的な傾向と同様であった¹⁰⁾。第6波の流行株であるオミクロン株の系統別検出結果を図4に示す。2022年第8週 (2022/2/21~2/27)まではBA.1系統が流行の主流であったが、第9週 (2022/2/28~3/6)にBA.2系統が検出されると、徐々に検出割合が高まり、第13週 (2022/3/28~4/3)には、解析株の半数がBA.2系統であった。2022年6月時点では、本県における流行の主流系統はBA.2系統に置き換わっている¹¹⁾。ゲノム解析の結果から、本格的な流行波が始まる前に、次

の流行主流株が検出されていることから、変異株PCRやゲノム解析によるサーベイランスを継続することで、新たな変異株による流行の端緒を早期に探知できる可能性がある。それらの解析結果を行政等の関係機関と共有することで、迅速なまん延防止対策に寄与できると考えられる。今後も、新たな変異株の出現・流行に備えて、検査・解析体制を維持していくことが必要と考えられた。

謝 辞

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長崎市、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: Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2022.5.20)
- 2) 国立感染症研究所: 感染・伝播性の増加や抗原性の変化が懸念される 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の変異株について (第16報) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11119-covid19-16.html> (2022.5.20)
- 3) 令和4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7.2版, p6
- 4) 長崎県環境保健研究センター所報 66 , (2020) 資料, 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
 - 5) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1
 - 6) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター: 新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル-Qiagen 社 QiaSEQ FX 編 ver.1.4
 - 7) NextClade: <https://clades.nextstrain.org/> (2022.6.23)
 - 8) PangoLineage: <https://pangolin.cog-uk.io/> (2022.6.23)
 - 9) UK Health Security Agency: SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England, Technical briefing 32, 17 December 2021
 - 10) 厚生労働省: 新型コロナウイルス ゲノムサーベイランスによる系統別検出状況 (国立感染症研究所), https://www.mhlw.go.jp/stf/eisakunitsuite/newpage_00061.html (2022.5.20)
 - 11) 長崎県: 長崎県内の発生状況 ゲノム解析状況, https://www.pref.nagasaki.jp/bunrui/hukushi-hoken/kansensho/corona_nagasaki/corona_nagasaki_shousai/ (2022.6.23)

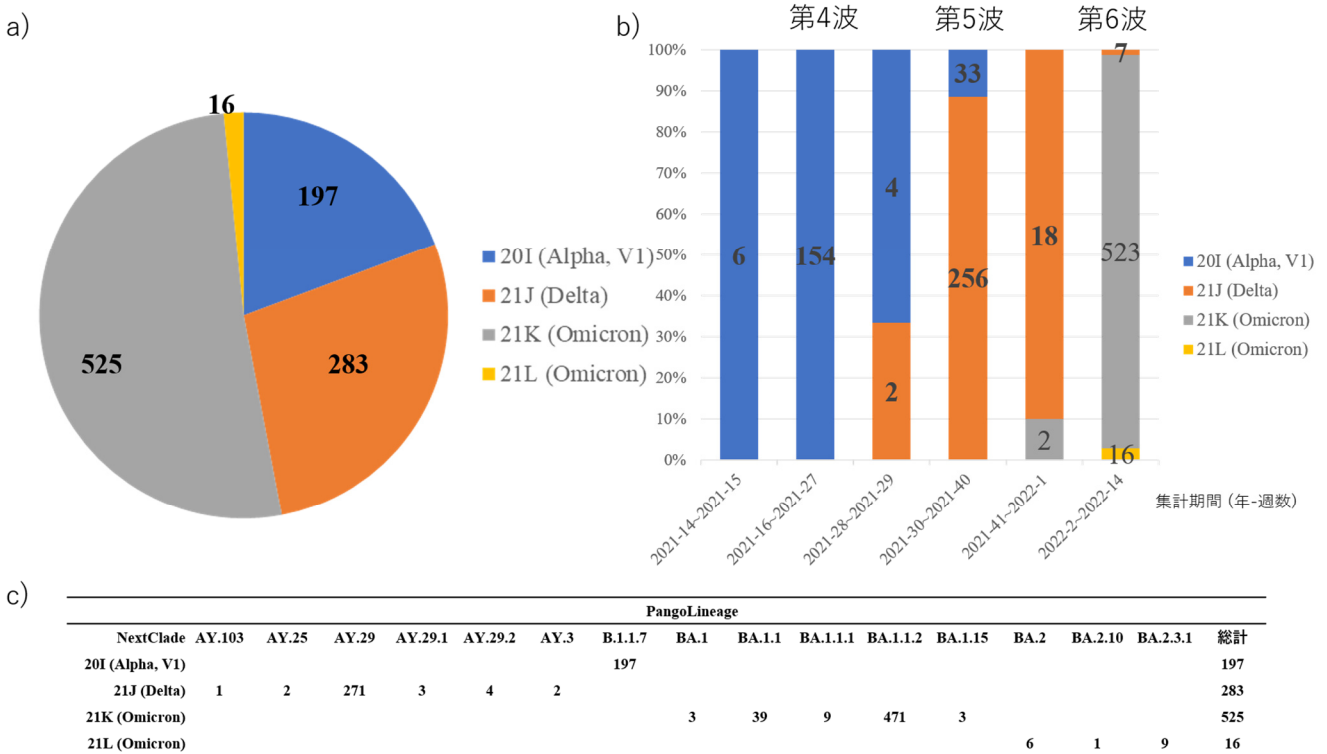


図3 長崎県検出株のNextClade, PangoLineageによる系統分類

- a): 長崎県において決定した1021株のNext Cladeによる分類結果 (円グラフ中の表示は、Clade名, 検出数, 全体に占める検出率を表す)
- b): 決定した1021株の各流行波における検出率の推移
- c): 検出されたCladeのPangoLineageによる系統分類結果 (縦軸がNextCladeによる分類、横軸が各CladeのPangoLineageによる系統分類を示す)

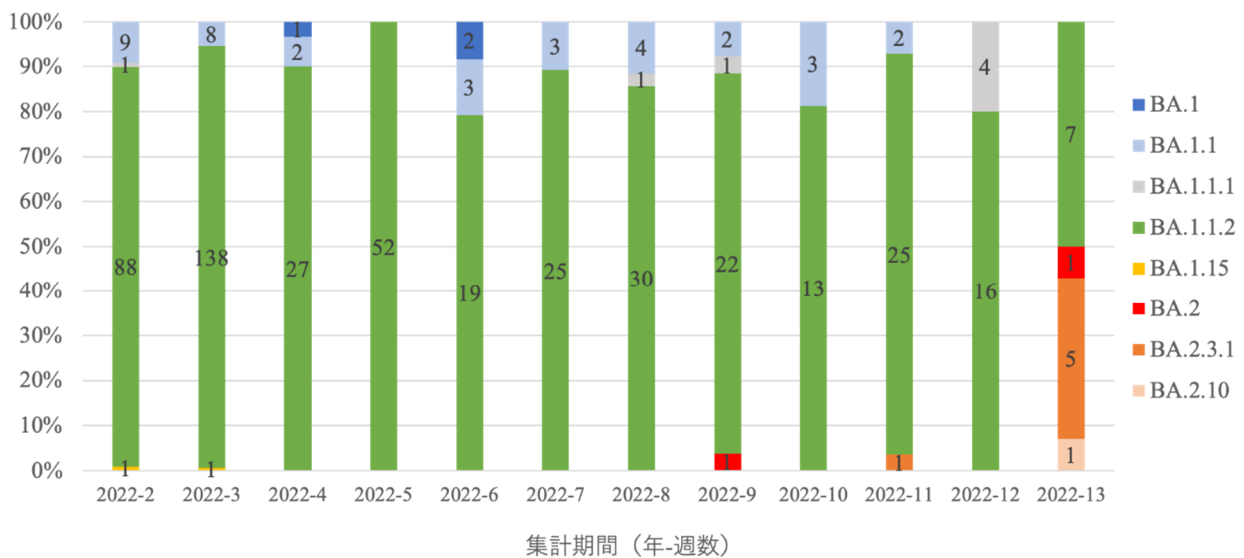


図4 第6波におけるオミクロン株検出系統の推移

Overview of Testing for SARS-CoV-2 in Nagasaki Prefectural Institute of Environment and Public Health (2021)

Fumiaki MATSUMOTO, Yumika TAKAKI, Fumika NAKAMINE, Yuji MIGITA, Guoxi CAI, Midori KAWANO, Yuina YAMAGUCHI, Motoki IHARA and Akira YOSHIKAWA

Nagasaki Prefecture began testing for SARS-CoV-2 using real-time polymerase chain reaction (PCR) in February 2020, and a total of 22,636 samples were tested from April 1, 2021, to March 31, 2022. Furthermore, screening PCR was performed to detect mutant strains, and a genome analysis system using a next-generation sequencer was developed in July 2021 to perform a detailed phylogenetic classification of dominant strains in the prefecture. The findings indicated that strain Alpha B.1.1.7 was the primary epidemic strain from April to July 2021, and Delta AY.29 was the primary epidemic strain from August to October 2021. Furthermore, from January to March 2022, the Omicron BA.1.1.2 was the predominant strain, but a new BA.2 strain was detected in February and was replacing it by the end of March.

Continuous surveillance using next-generation sequencers was practiced to facilitate the early detection of the beginning of an epidemic caused by a new mutant strain and to take prompt measures to stop the spread of the disease.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, Variant of Concern, Whole Genome Sequence