

ノート

三重県における新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の ゲノム分子疫学調査 (2020 年 1 月~2021 年 10 月)

An epidemiological study of the SARS-CoV-2 genome
-Mie Prefecture, Japan- (January 2020 - October 2021)

矢野拓弥, 北浦伸浩, 中井康博

Takuya YANO, Nobuhiro KITAURA and Yasuhiro NAKAI

キーワード: 新型コロナウイルス, SARS-CoV-2, ゲノム解析, NGS

国内のSARS-CoV-2の流行は、複数回の感染者数のピーク(2020年春先の第1波から2021年夏季の第5波)があり、国内の各自治体はSARS-CoV-2によるクラスターの発生源の特定と濃厚接触者の追跡によって感染拡大を封じ込める対策を実施してきた。第1波は、中国(武漢)で発生したSARS-CoV-2を起点に、本県においては2020年1月以降、武漢由来のA系統に近縁であるB.1系統が検出されたが、2020年3~4月には欧州由来ウイルスのB.1.1系統が主に流行していた。

2020年の夏季(7~9月)の第2波は、B.1.1系統から派生したB.1.1.284系統によるものであった。

第3波は2020年12月以降の冬季に、もう一つの欧州由来ウイルスであるB.1.1.214系統と第2波で主流となったB.1.1.284系統が混在して流行していた。また、2020年11月を中心とした南アジアからの流入ウイルス(B.1.36系統)による地域コミュニティでの感染拡大がみられたが、保健所等のクラスター対策により、封じ込められ、その後の拡散は確認されていない。

第1から第3波の流行の主流となった、欧州由来のD614G変異を有するウイルスは、その後も、現在まで続いているが、第4波はB.1.1.7系統(N501Y変異)とR.1系統、第5波はB.1.617.2系統(L452R変異)による流行であった。

はじめに

2019年12月以降に中国湖北省武漢市で Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) が感染拡大し、その後、日本国内においても患者が発生し¹⁻³⁾、本県においても、2020年1月下旬に、同ウイルスが検出され⁴⁾、以後、世界的な流行に至った⁵⁻⁷⁾。国内の各自治体では積極的疫学調査を実施し、クラスターの発生源の特定と濃厚接触者の追跡によって感染拡大を封じ込める対策を行ってきた。SARS-CoV-2 の感染クラスターに特有な遺伝子情報およびクラスター間の共通性を解析⁸⁾するために、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターと全国の地方衛生研究所および検疫所等でゲノムネットワークが構築された。

流行当初は、国内で検出された SARS-CoV-2 は、全国の地方衛生研究所より陽性検体の一部が国立感染症研究所に集められ、次世代シーケンサー

(Next Generation Sequencer ; NGS) を使用し、SARS-CoV-2 (一本鎖プラス鎖 RNA ウイルス ; 全長 29.9 kb) のゲノム配列情報が確定されていた。現在は、各自治体で NGS とその関連機器の整備が進められ、国内のゲノム解析体制が強化された。本県においても、2020年3月以降、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの解析支援のもとにゲノム解析の体制構築に取り組み、変異ウイルスの動向監視を継続的に行っている。

以下に、本県における SARS-Cov-2 陽性者について、ゲノム解析による流行ウイルスの系統および変異ウイルスの動向についての解析結果を報告する。

対象と方法

1. 調査対象

2020年1月~2021年10月に新型コロナウイルス行政検査において、県内の医療機関を受診した呼

吸器症状等を呈し、SARS-CoV-2陽性となった患者検体（鼻汁、鼻咽拭い液、喀痰、唾液等）を対象とした。SARS-Cov-2陽性者のうち、Real time RT-PCRにより得られたCt（Threshold Cycle）値（30未満）を指標に、選定した1445件について、SARS-CoV-2の全長塩基配列を決定しゲノム解析を実施した。

採取年別の対象者数の内訳は、2020年3月1件、4月16件、5月0件、6月0件、7月38件、8月76件、9月81件、10月7件、11月61件、12月80件である。2021年は1月223件、2月95件、3月131件、4月183件、5月84件、6月73件、7月114件、8月130件、9月25件、10月27件を対象とした。

SARS-CoV-2陽性者の検体は、新型コロナウイルス感染症患者に対する積極的疫学調査実施要領に基づき採取され、医療機関において記入された調査票（患者情報）の使用にあたっては、倫理的配慮として、個人情報保護などに留意し実施した。

2. SARS-Cov-2 の全長塩基配列解析

SARS-CoV-2陽性者の臨床検体からのウイルスRNA抽出には、QIAamp Viral RNA mini Kit（QIAGEN）等を用いた。当所におけるSARS-CoV-2のNGS解析には、糸川らの新型コロナウイルスのゲノム解析プロトコル⁹⁾に従い、NGSライブラリー調製を実施した。得られた全長塩基配列を用いて、本ウイルスの系統分類およびハプロタイプ・ネットワーク図の作成を実施し遺伝子情報の共通性を解析した。

結果

1. SARS-CoV-2系統分類別検出数

SARS-Cov-2陽性者1445件について、SARS-CoV-2の全長塩基配列を決定しゲノム解析を実施した結果、A系統（1件）、B.1.1系統（17件）、B.1.1.284系統（272件）、B.1.1.214系統（399件）、B.1.36系統（19件）、R.1系統（65件）、B.1.1.7系統（455件）、B.1.617.2系統（217件；内訳AY.29；212件、AY.29.1；3件、AY.42；2件）であった。

2. 検体採取月別のSARS-CoV-2系統分類

ゲノム解析を行ったSARS-Cov-2陽性者1445件について、検体採取月別の系統分類を図1に示した。A系統は2020年3月（1件）、B.1.1系統は4月（16件）、8月（1件）であった。

B.1.1.284系統は、主に夏季の2020年7月（34件）、8月（68件）、9月（81件）に多く検出され、その後も少数ながらも検出が続いた。冬季に再び検出され、2020年12月に13件、2021年1月には58件検出された。

B.1.1.214系統は、2020年7月（4件）、8月（7件）夏季においても確認されたが、主として、2020年11月～2021年3月の冬季に380件と多数検出され、流行の主流となった。

B.1.36系統は、2020年10～12月に19件、R.1系統は2021年1～5月に65件検出された。

B.1.1.7系統は、2021年3～8月に455件確認され、流行の主流となった。

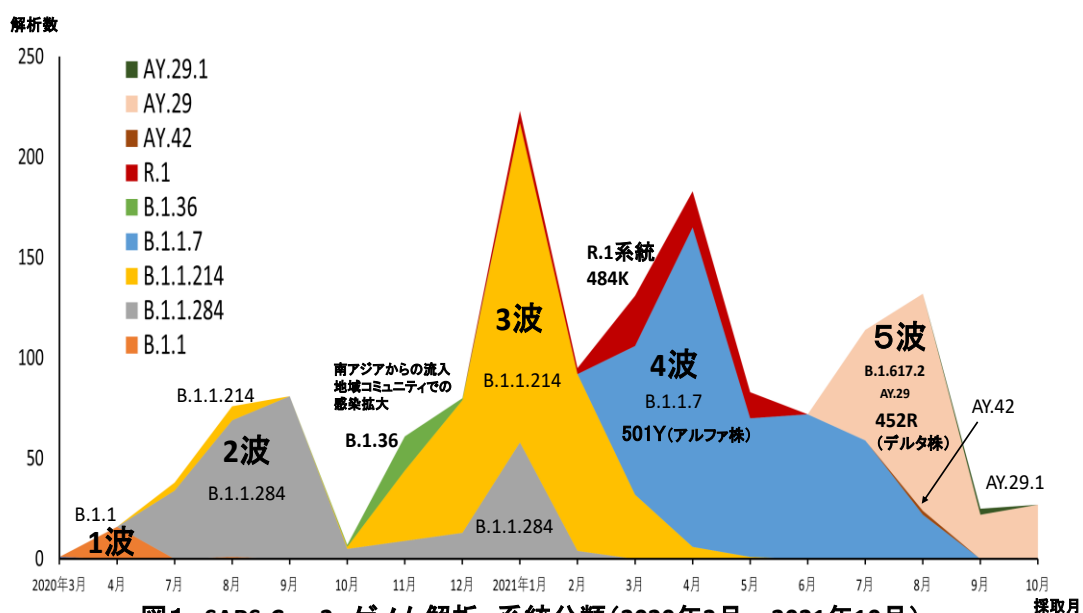


図1 SARS-Cov-2 ゲノム解析 系統分類(2020年3月～2021年10月)

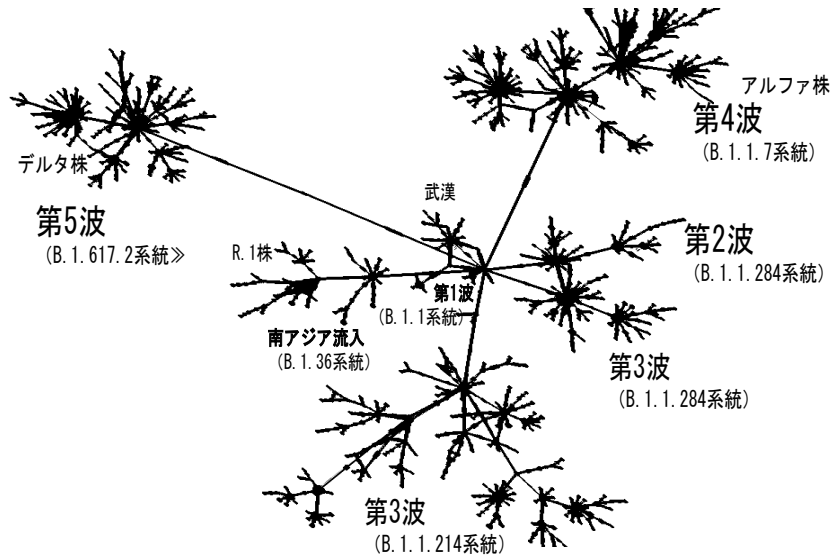


図2 SARS-Cov-2 ゲノムネットワーク解析図 (2020年3月～2021年10月)

B.1.617.2系統は、2021年夏季に主流行し、7月(55件)、8月(108件)、9月(22件)、10月(27件)であった。

3. 第1波～第5波における流行ウイルスの系統

ゲノム解析を行ったSARS-Cov-2陽性者について、第1波～第5波の流行についてゲノムネットワークにおける系統分類を図2に示した。

1.1 武漢由来 (B.1系統) と第1波 (B.1.1系統)

中国(武漢)で発生したSARS-CoV-2を起点に、2020年1月以降、武漢由来のウイルス(A系統)に近縁なウイルス(B.1系統)が検出された。2020年3～4月には欧州由来ウイルス(B.1.1系統)による流行が確認された。

1.2 第2波 (B.1.1.284系統)

欧州由来ウイルス(B.1.1系統)から派生したSARS-CoV-2(B.1.1.284系統)により、2020年の夏季(7～9月)に第2波となる流行がみられた。一部で、同由来のB.1.1.214系統の検出もみられた。

1.3 第3波 (B.1.1.214系統, B.1.1.284系統)

2020年12月以降は、夏季に検出されていた異なる欧州由来ウイルス(B.1.1.214系統)による第3波の感染拡大がみられ、さらに第2波で主流となったSARS-CoV-2(B.1.1.284系統)も混在していた。

加えて、本県では2020年10～12月には、南アジアからの流入ウイルス(B.1.36系統)による地域コミュニティでの感染拡大がみられた。

1.4 第4波 (R.1系統, B.1.1.7系統; アルファ株)

2021年3月以降は、E484K変異(R.1系統)を有するウイルスと英国から報告された新規の変異ウイルス(B.1.1.7系統; アルファ株)による患者が増加し、第4波となる流行がみられた。

1.5 第5波 (B.1.617.2系統; デルタ株)

インドで感染者が多発していたL452R変異を有する変異ウイルス(B.1.617.2系統; デルタ株)の第5波の流行がみられた。

本県で検出されたB.1.617.2系統のうち、大部分が同系統の細分化されたAY.29に属していた。また、2021年8月AY42が2例、2021年9月には、新たにAY.29.1に分類されるウイルスが3件検出されている。

その他、2021年3月にインドへの渡航歴のあるSARS-CoV-2陽性者からカッパ株(旧称)1例が確認されたが、その後は、検出されていない。

考察

国内のSARS-CoV-2における流行は、複数回の感染者数のピーク(2020年春先の第1波から2021年夏季の第5波)を経験し、国内の各自治体はSARS-CoV-2によるクラスターの発生源の特定と濃厚接触者の追跡によって感染拡大を封じ込める対策を実施してきた。

第1波は、中国(武漢)で発生したSARS-CoV-2を起点に、本県においては2020年1月以降、武漢由来のA系統に近縁であるB.1系統が検出されたが、2020年3～4月には欧州由来ウイルスのB.1.1系統が主流行していた。

2020年の夏季（7～9月）の第2波はB.1.1系統から派生したB.1.1.284系統によるものであった。

第3波は2020年12月以降の冬季には、もう一つの欧州由来ウイルスであるB.1.1.214系統と、第2波で主流となったB.1.1.284系統が混在し、感染者が増加したものと思われる。また、本県では2020年11月を中心に、南アジアからの流入ウイルス（B.1.36系統）による地域コミュニティでの感染拡大がみられた。感染事例の増加は、多系統のウイルスの動向によるものと思われ、保健所等のクラスター対策により封じ込められ、その後の拡散は確認されていない。

第1～第3波の流行は、欧州由来のSARS-CoV-2のSpikeタンパク質にD614G変異を有するウイルスによるもので、同変異は現在まで継承されているが、2021年春季以降は、新たな変異ウイルスが関与している。第4波は、N501Y変異（B.1.1.7系統）を持つウイルスで、第5波はL452R変異を有するウイルス（B.1.617.2系統）による流行であった。N501Y変異を有するSARS-CoV-2では、感染力の増加¹⁰が、L452R変異を有するウイルスでは、宿主の免疫回避能力が高まる可能性^{11,12}がそれぞれ報告され、流行拡大の要因の一つと推察された。また、国内においてアルファ株とデルタ株の組換え体とみられるSARS-CoV-2ウイルスの検出が報告¹³され、公衆衛生リスクは無いことが示唆されているが、留意する事例であると思われた。さらに2021年1月以降に検出されたE484K変異を有するR.1系統等は患者やワクチン接種者の血清中和活性の低下が懸念^{14,15}されており、今後も、同変異を有するウイルスの動向監視が必要である。

2021年11月には、南アフリカで新たに複数（32カ所）のアミノ酸変異を伴うSARS-CoV-2変異株（B.1.1.529系統）の検出が多事例報告^{16,17}された。現時点（2021年11月末）では、その詳細は不詳であり、今後の本系統ウイルスの最新情報を注視する必要がある。国内への流入を早期に察知するため本系統ウイルスのゲノム解析の実施が必須である。しかしながら、公衆衛生上、迅速な結果の還元が求められているなかで、ゲノム解析には時間を要するため解析数には限界があり、かつ迅速性に欠ける。さらには解析には一定のウイルス量が必要であることも課題である。これらのことから、迅速性かつ多検体処理能力を有したリアルタイムPCRを用いたスクリーニング検査により同系統の変異識別を行ったうえで、ゲノム解析を並行し実施することで、効率的なゲノムサーベイランスが可能となり監視態勢の強化に繋がるものと思われる。

謝 辞

SARS-CoV-2のゲノム解析支援をして頂きました国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの諸先生方に深謝いたします。

新型コロナウイルス感染症に対する積極的疫学調査において検体採取を担当された医療機関の諸先生方、保健所等の関係各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：日本国内の新型コロナウイルス感染症第一例を契機に検知された中国武漢市における市中感染の発生，病原微生物検出情報，**41**，143-144(2020)。
- 2) 国立感染症研究所：国内で報告された新型コロナウイルス感染症確定例12例の記述疫学（2020年2月3日現在）病原微生物検出情報，**41**，48-49(2020)。
- 3) 国立感染症研究所：国内初の新型コロナウイルスのヒト-ヒト感染事例，病原微生物検出情報，**41**，63-64(2020)。
- 4) 厚生労働省：新型コロナウイルスに関連した肺炎の患者の発生について(10例目)
https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_09236.html (2021.11.13 access)
- 5) Holshue M. L, DeBolt C, Lindquist S, et al : First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 929-936 (2020).
- 6) Florian Götzinger, Begoña Santiago-García, Antoni Noguera-Julián, et al : COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study, *Lancet Child Adolesc Health*, **4**(9):653-661 (2020).
- 7) 国立感染症研究所：海外におけるCOVID-19の流行状況について（2020年6月4日時点）病原微生物検出情報，**41**，105-106(2020)。
- 8) 関塚剛史，糸川健太郎，谷津弘仁 他：新型コロナウイルスSARS-CoV-2のゲノム分子疫学調査（2020年10月26日現在），病原微生物検出情報，**42**，14-17(2021)。
- 9) 糸川健太郎，関塚剛史，橋野正紀 他：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Qiagen社 QiaSEQ FX 編- version 1.2 (2021/09/14)–
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SARS-CoV2_genome_analysis_manual_QIASEQFX_ver_1_2_211006.pdf (2021.11.20 access)
- 10) Kathy Leung, ORCID icon, Marcus HH Shum, Gabriel M Leung et al : Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-

- CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020, *Euro Surveill* 26, 2021
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106>
(2021.11.10 access)
- 11) Veronika Tchesnokova, Hemantha Kulakesara, Lydia Larson, et al : Acquisition of the L452R mutation in the ACE2-binding interface of Spike protein triggers recent massive expansion of SARS-Cov-2 variants, *bioRxiv*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432189>
(2021.11.10 access)
- 12) Pragya D Yadav, Gajanan N Sapkal, Priya Abraham, et al : Neutralization of Variant Under Investigation B.1.617.1 With Sera of BBV152 Vaccinees, *Clin Infect Dis*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab411>
(2021.11.10 access)
- 13) Tsuyoshi Sekizuka, Kentaro Itokawa, Masumichi Saito et al : Genome Recombination between Delta and Alpha Variants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP)*doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.11.21264606>
(2021.11.10 access)
- 14) Sonia Jangra, Chengjin Ye, Raveen Rathnasinghe, et al : The E484K mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces but does not abolish neutralizing activity of human convalescent and post-vaccination sera, *medRxiv*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.26.21250543>
(2021.11.10 access)
- 15) Zijun Wang, Fabian Schmidt, Yiska Weisblum, et al: mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants, *Nature* 592: 616-622, 2021
- 16) 国立感染症研究所 : SARS-CoV-2の変異株 B.1.1.529系統について (第1報)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10790-cepr-b11529-1.html> (2021.11.26 access)
- 17) 国立感染症研究所 : SARS-CoV-2の変異株 B.1.1.529系統について (第2報)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus.html> (2021.11.29 access)