

# 栃木県内で検出された SARS-CoV-2 (新型コロナウイルス) の分子疫学解析 【令和3(2021)年度】

微生物部

水越文徳、齋藤明日美、関川麻実、若月章<sup>1</sup>、青木均、  
渡邊裕子、大山周子、根本美香、船渡川圭次<sup>2</sup>、長谷充啓<sup>1</sup>、  
永木英徳、石岡真緒<sup>1</sup>、加藤治<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>宇都宮市保健福祉部衛生環境試験所、<sup>2</sup>元保健環境センター)

## 1 Introduction

2019年末に中国の武漢市で報告されて以来、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は世界中に拡大し、2022年8月18日現在、世界で約5億9328万人が感染、約644万人が死亡しており、日本でも、感染者が約1618万人、死者は約3万5千人にのぼる<sup>1)</sup>。感染拡大を続ける原因の一つに、次々と出現する変異株の存在があげられる。

COVID-19の原因であるSARS-CoV-2は、2019年12月に出現して以来、塩基配列を変異させることで抗原性や病原性を変化させ、感染拡大を繰り返してきた<sup>2)</sup>。特に、ヒトの免疫を回避するアミノ酸変異を獲得したエスケープ変異株や、ヒトの細胞に感染する際の受容体への親和性が高まっている可能性がある変異株などはしばしば流行の主流となり、懸念される変異株(Variant of Concern: VOC)、注目すべき変異株(Variant of Interest: VOI)としてWHOに定義されている<sup>3)</sup>。現在(2022年8月)は、オミクロン変異株が主流であり、BA.1、BA.2のLineagesに分岐し、さらに世界の地域ごとに特有の亜系統が流行している<sup>4)</sup>。

ウイルスは、遺伝子を変異させながら進化しており、特にSARS-CoV-2のようなRNAウイルスでは変異がしやすいとされている<sup>5)</sup>。したがって変異株の出現や分布などを把握することは、COVID-19の終息に必要な不可欠である。2022年8月時点でSARS-CoV-2の変異速度は、27.353塩基変異/ゲノム/年と推測されており、理論上では約13.3日に1塩基が変異していることになる<sup>6)</sup>。日本国内でも、SARS-CoV-2は変異を繰り返しながら、また海外から変異株が侵入しながら、様々な変異株が流行してきた<sup>7~10)</sup>。

このような変異は連続的に発生しており、ウイルス間の塩基配列を比較することで、株間の関係性を検討することができる。SARS-CoV-2の変異株は、塩基配列を解読してアミノ酸変異を確認し、Lineage等の定義を分類する。今回、栃木県内で検出されたSARS-CoV-2の全ゲノムを解読し、Lineage、亜系統の推移、それぞれの変異株における分子生物学的な特徴について検討した。

なお、本稿は令和3(2021)年度の年報であるため、令和4(2022)年3月31日までに採取された検体の解析結果の報告となる。

## 2 Materials and Methods

### 2.1 検体

2021年4月5日から2022年3月31日までに採取され、SARS-CoV-2の行政検査として搬入された検体を用いた。この内、陽性だった検体について無作為に(一部は意図的に)選択した検体をNGSで全ゲノム解読した。

### 2.2 全ゲノム解読

咽頭ぬぐい液、唾液等の検体から、QIAamp Viral RNA Kits (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。抽出RNA中のSARS-CoV-2の全ゲノム解読は、新型コロナウイルスゲノム解読プロトコルに従って実施した<sup>11)</sup>。RNAを逆転写反応し、Multiple PCRによってSARS-CoV-2の遺伝子を増幅させた。それらのPCR産物を生成した後、NGSライブラリとして調整した(フラグメント処理、アダプターライゲーションなど)。ライブラリを精製後、宇都宮市ではMinION Mk1c (Oxford Nanopore)、栃木県ではiSeq (illumina社)を用いてゲノムを解読した。

得られたFASTQデータは、QIAGEN CLC Genomics Workbench (Filgen, Inc.) 等によりQuality Checkを行い精度の低いデータは除外した。国立感染症研究所のWeb toolを用いて、Short readsからアセンブリされたコンセンサス配列を構築して、検体中のSARS-CoV-2の塩基配列とした<sup>12)</sup>。ゲノムの両末端以外にNなどATCG以外の配列を含まないデータについて、以降の解析を行った。

### 2.3 Lineage および亜系統の分類、および感染者数の推移

それぞれの塩基配列情報について、Pangolin COVID-19 Lineage Assigner (<https://pangolin.cog-uk.io/>)、Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>) のweb toolで解析した。Lineageの決定は、Pangolin version 4.1.1、pangolin-data version v1.12による定義に従って分類した。

また、栃木県内の感染者のデータは厚生労働省ホームページ (<https://covid19.mhlw.go.jp/>) の情報を引用した。

## 2.4 時系列ハプロタイプネットワーク図の作成

解析するゲノム配列は、MAFFT<sup>13)</sup>でアライメントして、ORF1aからN遺伝子までの領域(参照株MN908947:266~29533ntの領域に相当)の塩基配列をトリミングした。MEGA 11<sup>14)</sup>でFASTA ファイルをNEXUS ファイルに変換後、それぞれの株を検出した週などの特性情報を追記した。最終的に、PopART<sup>15)</sup>を用いてハプロタイプネットワーク図を作成した。

## 2.5 進化距離(evolutionary distance)

前述と同様に、MAFFT でアライメントして、ORF1a から N 遺伝子までの領域について MEGA 11 で p-distance(proportion of different sites)の進化距離を計算した。p-distance の値から総塩基数を乗じて、株間同士の変異塩基数を算出した。統計学的な比較には、Prism v8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて統計的に処理した。また、Violin plot での可視化は、Orange<sup>16)</sup>を用いて作成した。

## 3 Results

### 3.1 Lineage および亜系統の推移

2021年4月5日から2022年3月31日までに採取された検体のうち、1560検体についてSARS-CoV-2の全ゲノムが解読できた。それらのLineageの推移および亜系統の内訳について、Fig. 1とTable. 1に示す。

2021年4月から流行していたAlpha変異株は、2021年7月を境にDelta株に置き換わり、栃木県内の感染者が増加した(第5波)。次いで、Omicron変異株であるBA.1系統は2021年12月に栃木県内で初めて検出され、その後、Delta変異株と入れ替わるように主流となり、再び感染者数も急増した(第6波)。一方、オミクロン変異株のBA.2系統は2022年1月に検出されて以降、BA.1系統から徐々に入れ替わった。

Delta変異株は、殆どの株がAY.29亜系統に分類され、他にはAY.75.3亜系統も若干検出された。一方、BA.1系統は、BA.1.1およびBA.1.1.xの亜系統が主流となったが、BA.1.15やBC.1の亜系統も確認された。

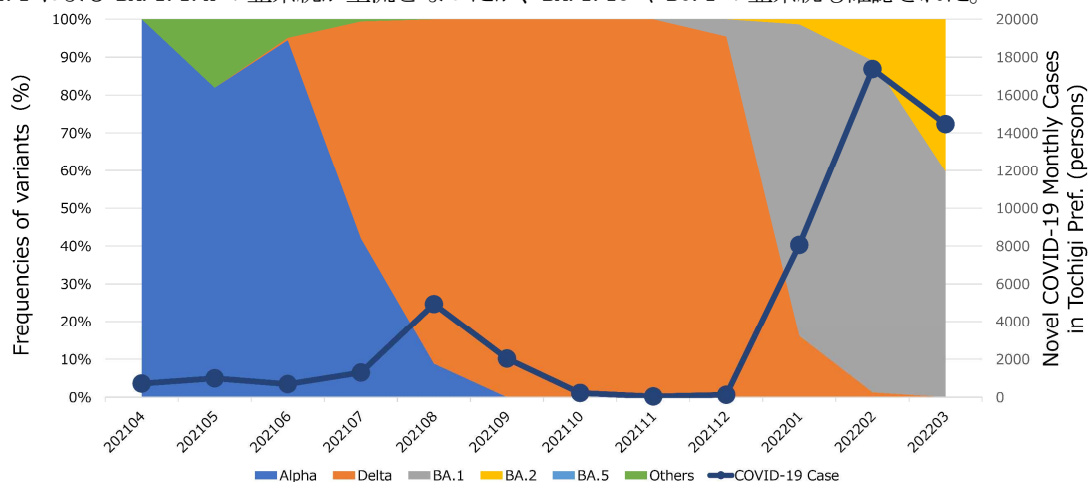


Fig. 1 栃木県内で検出されたSARS-CoV-2の変異株の割合と患者数の推移

### 3.2 Delta変異株の性状解析

2021年度において、主流となり、第5波の原因にもなったDelta株について、詳細に性状を検討した。

#### 3.2.1 時系列ハプロタイプネットワーク図における県内流行状況

県内で検出されたDelta変異株(528株)について、検出された週の情報を組み込んだ時系列ハプロタイプネットワーク図を作成した(Fig. 2, Supplementary Material. gif)。栃木県内で流行したデルタ変異株(主にAY.29)は、2塩基ほど異なる2つのNodesから、少しずつ変異を繰り返しながら拡大・流行した。

Delta変異株のピークが収まった後も、さらに、武漢株(MN908947)から遠ざかるように進化しているAY.29も確認され、それらはAY.29.2亜系統に属された。これらの株は、2021年12月から翌月にかけて検出されたが、BA.1系統に置き換わりによって検出されなくなった。

#### 3.2.2 遺伝子学的な特徴

Delta変異株のAY.29は、二つの同心円を描くように拡大していった。そこで、Fig. 2の右側の同心円をGroup A、左側の同心円をGroup Bとして解析を行った。

Fig. 3には、全てのAY.29、Group AおよびGroup B毎の検出数を週毎に可視化した。Group Aでは、第33、34週目を検出数のピークとして第5波のみで検出された。特に第28週は、AY.29.1のみが検出されたが、その後、第31週にはAY.29が主流となり、第33週には検出されなくなった。一方、Group Bでは、第5波の第31週目前後にピークを示し、さらに第48週目以降の第6波でも検出された。第51週目以降では、AY.29.2亜系統が殆どを占めた。

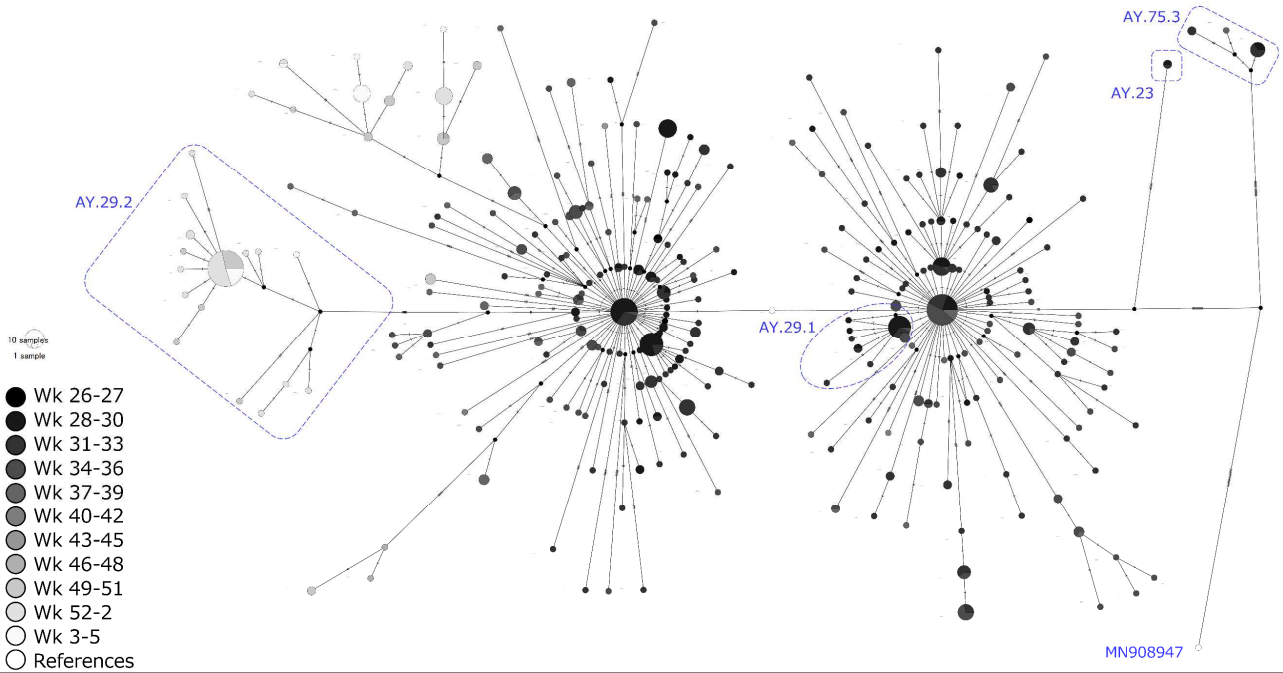


Fig. 2 栃木県内で検出された SARS-CoV-2 Delta 変異株の時系列ハプロタイプネットワーク図

これらの遺伝的な多様性を比較するため、p-distance を全ての AY. 29、Group A および B ごとに解析し、Fig. 4 に示した。全ての AY. 29 系統間では、平均 8.670 (SD±4.837) 塩基の違いが認められた。一方、Group A では、平均 5.043 (SD±2.889)、Group B は平均 9.039 (SD±5.271) となった。それぞれのグループ間において、全てに有意差が認められた ( $p < 0.0001$ : Unpaired t test with Welch's correction)。

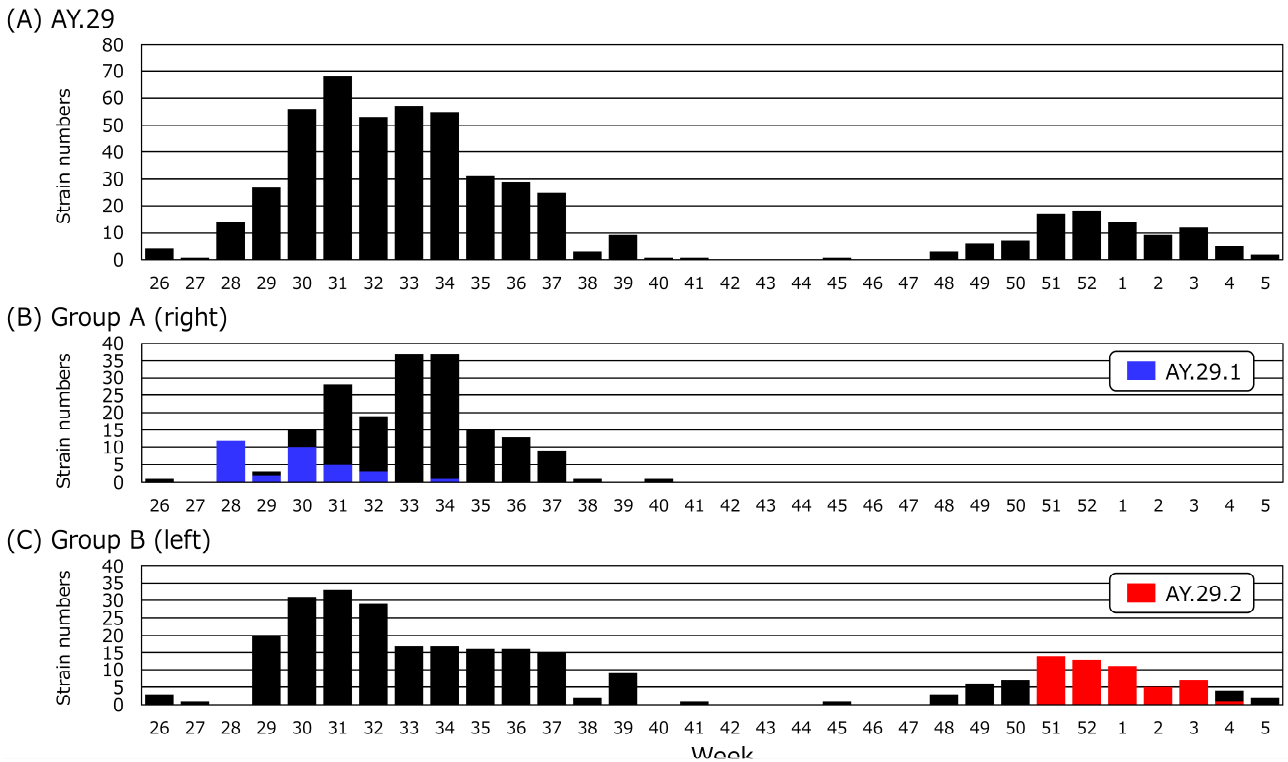


Fig. 3 栃木県内における Delta 変異株 AY. 29 亜系統の検出数の推移

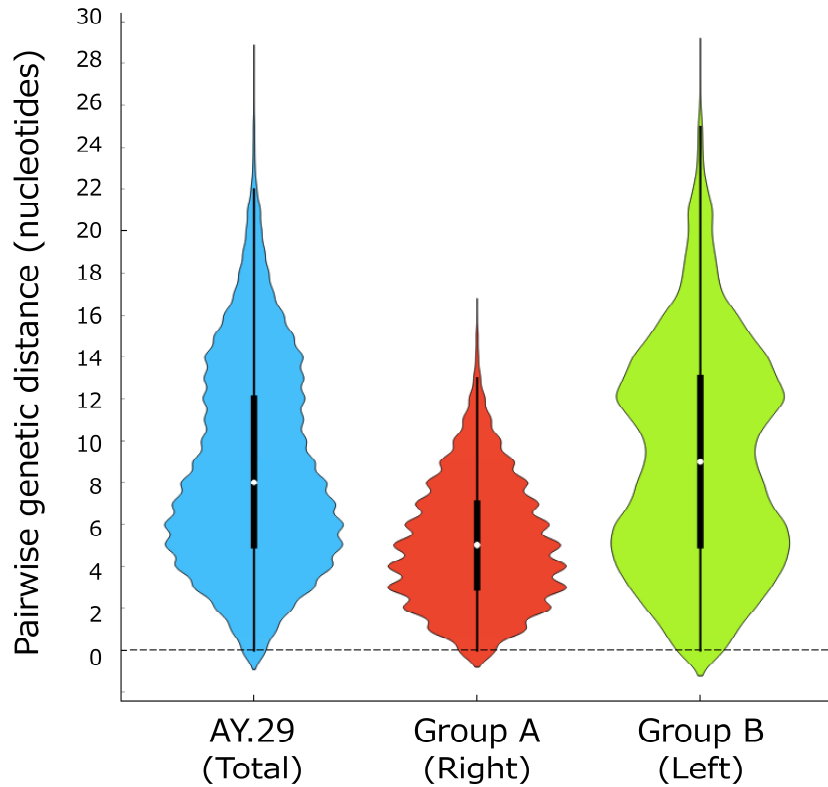


Fig. 4 栃木県内における Delta 変異株 AY.29 亜系統の進化距離

#### 4 Discussion

栃木県内で検出された SARS-CoV-2 の変異株は、Alpha 変異株、Delta 変異株、Omicron 変異株 BA.1、BA.2 の順に推移した。2021 年度では、Delta 株による第 5 波が発生し、主に AY.29 系統が主流となった。2021 年度後半の 12 月以降では Omicron 変異株は、BA.1 系統、次いで BA.2 系統へ置き換わりが生じて、全国的な動向と一致した<sup>7~10)</sup>。Delta 変異株、Omicron 変異株に置き換わるタイミングで第 5 波、第 6 波が始まっていることから、新たな変異株の出現は大流行の原因となる。SARS-CoV-2 の出現以来、全世界で全ゲノム解析が実施され、Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) などのデータベースで共有・公開されて、様々な情報ソースや解析ツールに利用されている。当センターで解析したゲノムの情報についても、国立感染症研究所のご尽力により GISAID に登録され、公開されている。このような global surveillance が COVID-19 終息に向けて必要不可欠である。

Delta 変異株について、AY.29 系統全体、およびハプロタイプネットワーク図で二つの同心円を示すグループ間の進化距離を解析した結果、武漢株から離れた方の同心円を描くグループ (Fig.2 の左側の同心円) の方において塩基の変異が多く、最も遺伝的に多様性があることが示された。このグループに含まれる AY.29.2 亜系統は、2021 年 12 月の第 6 波の始まりに検出された。この AY.29.2 亜系統は、スパイクタンパク質のレセプター結合領域内に Q414R の変異を有していたが、すぐに Omicron 変異株 BA.1 系統に置き換わるように検出されなくなった。しかしながら、ハプロタイプネットワーク図上で AY.29.2 を含むグループの遺伝子間の進化距離が高かったことから、活発な変異が繰り返されていた可能性が示唆される。その後、AY.29.2 亜系統は検出されなくなったが、ハプロタイプネットワーク図や系統樹などの分子疫学解析によって流行している株と異質の株を探知することが出来る。このように、SARS-CoV-2 を初めとしたウイルスは感染を繰り返しながら、長期間かけて変異を積み重ねて流行を引き起こす。したがって、全ゲノムを解読してウイルスの性状を把握し、監視を実施していくことが感染症の抑制に必要不可欠である。

ハプロタイプネットワーク図を用いて解析することは、新たな変異株の出現や流入を監視することだけでなく、株間の関係性が視覚的に表現できることから、クラスターの追跡や感染拡大の背景の推測、疫学情報との整合性の担保等に有益な情報を提供できると考える。よって、それらを早期に探知し適切に情報提供するために、今後もゲノム解析を実施していくことは意義深いと考える。しかしながら、ゲノム情報だけでは正確な感染状況に結び付けることはできないため、疫学情報と合わせて総合的に分析する分子疫学解析を実施していくことが重要である。このようにウイルスの性状を把握し、県内の疫学・公衆衛生に有益な情報を還元するため、今後も引き続き全ゲノム解読を実施していく。

## 5 Acknowledgements

SARS-CoV-2 のゲノム解析を実施するにあたり、多大な御協力、御助言、検体収集などに御尽力を頂いた国立感染症研究所、栃木県内の各健康福祉センター、栃木県感染症対策課など、COVID-19 対策の業務に携わる全ての方達に、心より深く感謝いたします。

## 6 References

- 1) COVID-19 Dashboard, Johns Hopkins University (<https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.)
- 2) Kaiming T *et al.*, The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants, *Nat Rev Genet.* 22, 757-773, 2021.
- 3) Naming SARS-CoV-2 variants, World Health Organization (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>)
- 4) Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6months, Nextstrain.org (<https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>) .
- 5) 佐藤 裕徳他, RNA ウイルスと変異, ウイルス, 55 221-230, 2005.
- 6) Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally since pandemic start, Nextstrain.org (<https://nextstrain.org/ncov/open/global/all-time?l=clock>)
- 7) 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) 2022年4月28日9:00時点 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11119-covid19-16.html>)
- 8) 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17報) 2022年6月3日9:00時点 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11180-covid19-17.html>)
- 9) 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18報) 2022年7月1日9:00時点 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11257-covid19-18.html>)
- 10) 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19報) 2022年7月27日9:00時点 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11346-sars-cov-2-19.html>)
- 11) 糸川健太郎他, 新型コロナウイルスゲノム解析マニュアル, (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>)
- 12) K Itokawa *et al.*, Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR, *PLoS One*, 15(9), e0239403, 2020.
- 13) Katoh K *et al.*, MAFFT multiple sequence alignment software version 11: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol*, 30, 772-780, 2013.
- 14) Tamura K *et al.*, MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027, 2021.
- 15) Leigh, JW *et al.*, PopART: Full-feature software for haplotype network construction, *Methods Ecol Evol*, 6, 1110-1116, 2015.
- 16) Demsar J *et al.*, Orange: Data Mining Toolbox in Python, *Journal of Machine Learning Research*, 14, 2349-2353, 2013.

Table.1 栃木県内で検出された SARS-CoV-2 の Lineage および亜系統

		Alpha	Delta			Omicron								Others			
		B.1.1.7	AY.29	AY.23	AY.75.3	BA.1 系統				BA.2 系統				R.1	B.1.346		
			AY.29.1			BA.1	BA.1.1	BA.1.15	BA.1.18	BC.1	BA.2	BA.2.3	BA.2.10	BA.2.29			
			AY.29.2				BA.1.1.x					BA.2.3.x		BA.2.10.x			
Total		414	517	2	9	1	454	11	1	18	17	65	4	3	43	1	
2021	Apr	6															
	May	159													34	1	
	Jun	154	1												8		
	Jul	71	94	1	2										1		
	Aug	24	242	1	6												
	Sep		80		1												
	Oct		6														
	Nov		2														
	Dec		42			1	1										
2022	Jan		48				226	9	1	9	2	1	1				
	Feb		2				131	2		4	6	11					
	Mar						96			5	9	53	3	3			