

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 【第二報】

微生物部

関川 麻実 水越 文徳¹ 齋藤 明日美 若月 章² 谷澤 輝²
 竿尾 友恵³ 若林 勇輝 青木 均⁴ 渡邊 裕子 大山 周子¹
 根本 美香 長谷 充啓² 永木 英徳 石岡 真緒²

(¹前保健環境センター) (²宇都宮市保健福祉部衛生環境試験所) (³宇都宮市保健所) (⁴現県南健康福祉センター)

1 はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、2019 年 12 月に中国の武漢市で報告されて以来世界中に拡大し、2023 年 5 月 8 日現在、世界では約 7 億 6522 万人が感染、約 700 万人が死亡しており、日本でも感染者が約 3372 万人、死者は約 7 万 5 千人にのぼる¹⁾。栃木県内でも感染者は約 42 万 8 千人となっており、計算上、県民の 5 人に 1 人が感染したことになる²⁾。

感染拡大が繰り返される要因のひとつに次々と出現する変異株の存在があげられる。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) はその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進化を続けているため、変異株の発生動向を監視することは、感染拡大防止のために必要不可欠な情報となる。そこで本稿では、栃木県内で検出され、栃木県保健環境センター及び宇都宮市衛生環境試験所において全ゲノム解読した SARS-CoV-2 について、Lineage 分類、亜系統の推移について検証し、分子疫学的に考察した。

なお、本稿は令和 4 (2022) 年度の年報であるが、令和 5 (2023) 年 4 月までに採取された検体の解析結果の報告とする。

2 材料と方法

2.1 検体

2021 年 5 月から 2023 年 4 月までの 2 年間に宇都宮市を含む栃木県内で採取され、SARS-CoV-2 が陽性となった検体から無作為 (一部は意図的) に選択し、次世代型シーケンサーによる全ゲノム解読の対象とした。

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-Qiagen 社 QiaSEQ FX 編および Oxford Nanopore Mk1c & NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編³⁾に従って全ゲノム解読を実施した。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、新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル-Qiagen 社 QiaSEQ FX 編および Oxford Nanopore Mk1c & NEB 社 AR および TIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編³⁾に従ってゲノムを解読した。

得られた FASTQ データは、QIAGEN CLC Genomics Workbench (Filgen, Inc.) や国立感染症研究所の Web tool である COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP) を用いて、SARS-CoV-2 の塩基配列を構築・決定した。Read Depth や Coverage などを確認し、Quality の低いデータを除外した。最終的な解析対象の数は、5170 株となった。

2.3 Lineage 及び亜系統の分類

検体由来の SARS-CoV-2 ゲノム配列について、Pangolin COVID-19 Lineage Assigner (pangolidata version v1.19)⁴⁾ および Nextclade (version 2.14.1)⁵⁾ の web tool で解析した (2023.5.9 現在)。

2.4 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、MAFFT⁶⁾ でアライメントし、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。MEGA11⁷⁾ 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、PopART⁸⁾ を用いてハプロタイプネットワーク図を作成した。

3 結果

3.1 Lineage 及び亜系統の推移

解析対象株の 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。

5170 株のうち、Alpha 変異株が 239 株、Delta 変異株が 611 株、Omicron 変異株が 4273 株、その他が 47 株であっ

た。Omicron 変異株の内訳は、BA. 1 系統(21K)が 580 株、BA. 2 系統(21L)が 514 株、BA. 4 系統(22A)が 17 株、BA. 5 系統、BF 系統など(22B)が 2678 株、BA. 2. 12. 1 亜系統(22C)が 10 株、CH. 1. 1 亜系統、BA. 2. 75 亜系統など(22D)が 147 株、BQ. 1 系統など(22E)が 278 株、その他 XBB 系統などが 49 株となった。

Alpha 変異株は 2021 年 5 月の時点では主流であったが、2021 年 5 月に Delta 変異株が初めて検出されると、2021 年 8 月までの約 3 ヶ月間で、Alpha 変異株と入れ替わるように主流となった。この時期は日本国内で第 5 波 (2021 年 7 月～10 月) が起きた時期と重なっており、栃木県内においても大規模な流行を引き起こし、そのほとんどが AY. 29 亜系統であった (Fig. 2)。

2021 年 12 月には Omicron 変異株の BA. 1 系統が初めて検出され、Delta 変異株との置き換わりが急速に進み、わずか 1 ヶ月あまりで感染の主流となり、第 6 波 (2022 年 1 月～5 月) を形成した。亜系統としては BA. 1. 1 亜系統が多くを占めていた。2022 年 1 月に BA. 2 系統が初めて検出されると、BA. 1 系統からの置き換わりは約 3 ヶ月をかけてゆっくりと進んだ (Fig. 3)。

その後、2022 年 6 月に BA. 5 系統が検出され、BA. 2 系統からの置き換わりが約 1 ヶ月で急速に進み、第 7 波 (2022 年 6 月～9 月) となって大きな感染拡大をもたらした (Fig. 4)。

第 8 波 (2022 年 10 月～2023 年 3 月) では、これまでの主流である BA. 5 系統に加え、CH. 1. 1 系統や BQ. 1 系統なども検出された。これまでの流行では単一の系統が多数を占める傾向であったのに対して、第 8 波は複数の系統で構成されているという特徴を有していた (Fig. 5)。

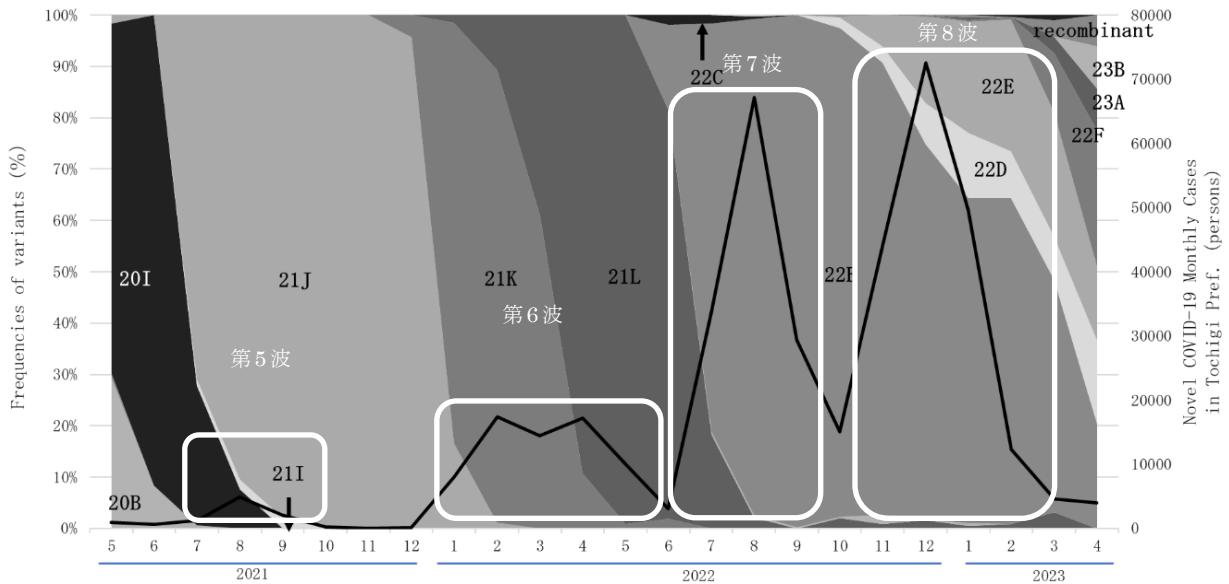


Fig.1 栃木県内における SARS-CoV-2 の変異株の割合と感染患者報告数の推移 (月毎)

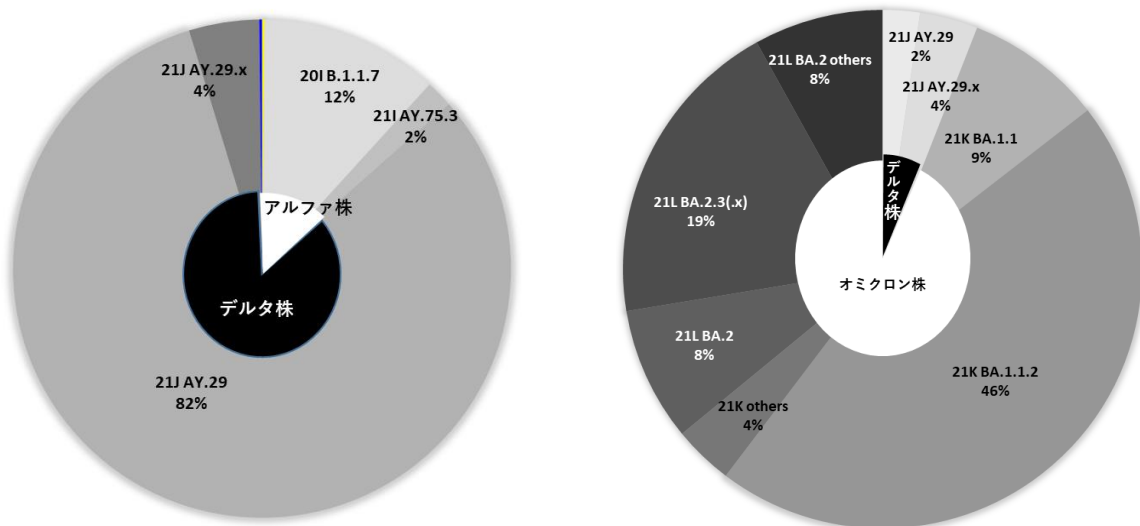


Fig. 2 第5波のLineage 割合(n=520)

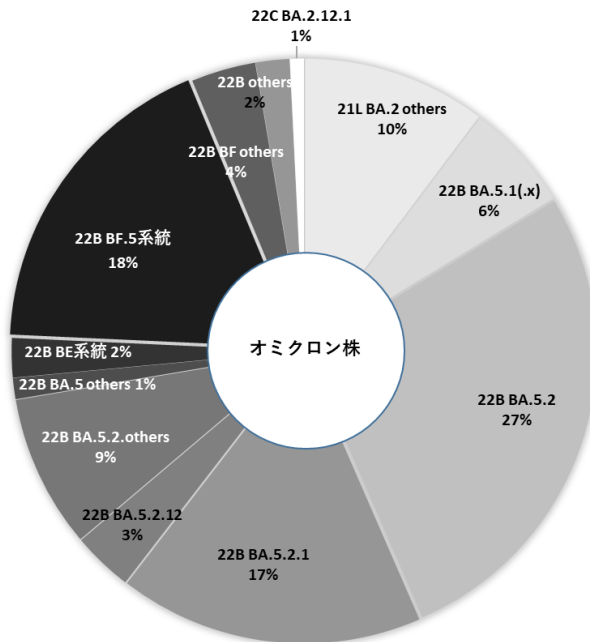


Fig. 3 第6波のLineage 割合(n=993)

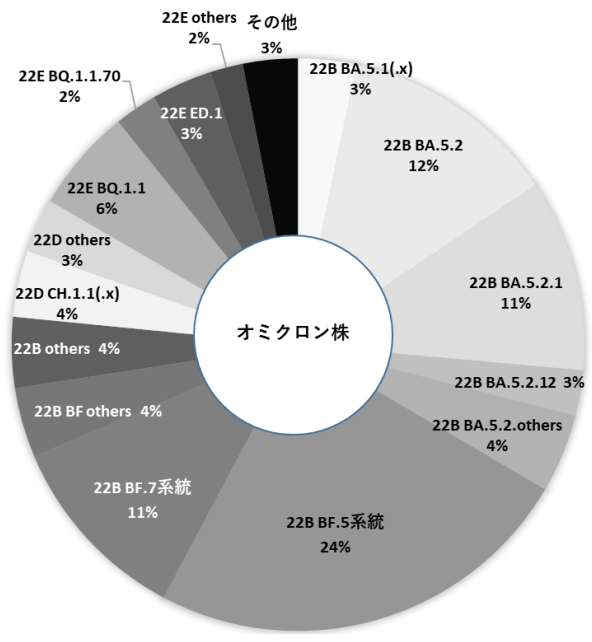


Fig. 4 第7波のLineage 割合(n=1277)

Fig. 5 第8波のLineage 割合(n=2001)

3.2 ハプロタイプネットワーク図による分子疫学解析

ハプロタイプネットワーク図とは、ウイルスの全ゲノム情報から変異箇所を解析して、ウイルス株の親子関係を図として示したものである。丸はNodeといい、同じ塩基配列の株が含まれ丸の大きさがウイルスの株数に比例する。なお、Nodeの色が濃いものが最初に検出されたものであり、週数を追うごとに色が薄くなっていくように表現している。第6波の主流であったBA.1系統と第7波、第8波の主流であったBA.5系統について、時系列ハプロタイプネットワーク図を作成した(Fig6、Fig7)。なお、ハプロタイプネットワーク図は2022年10月までのデータとする。

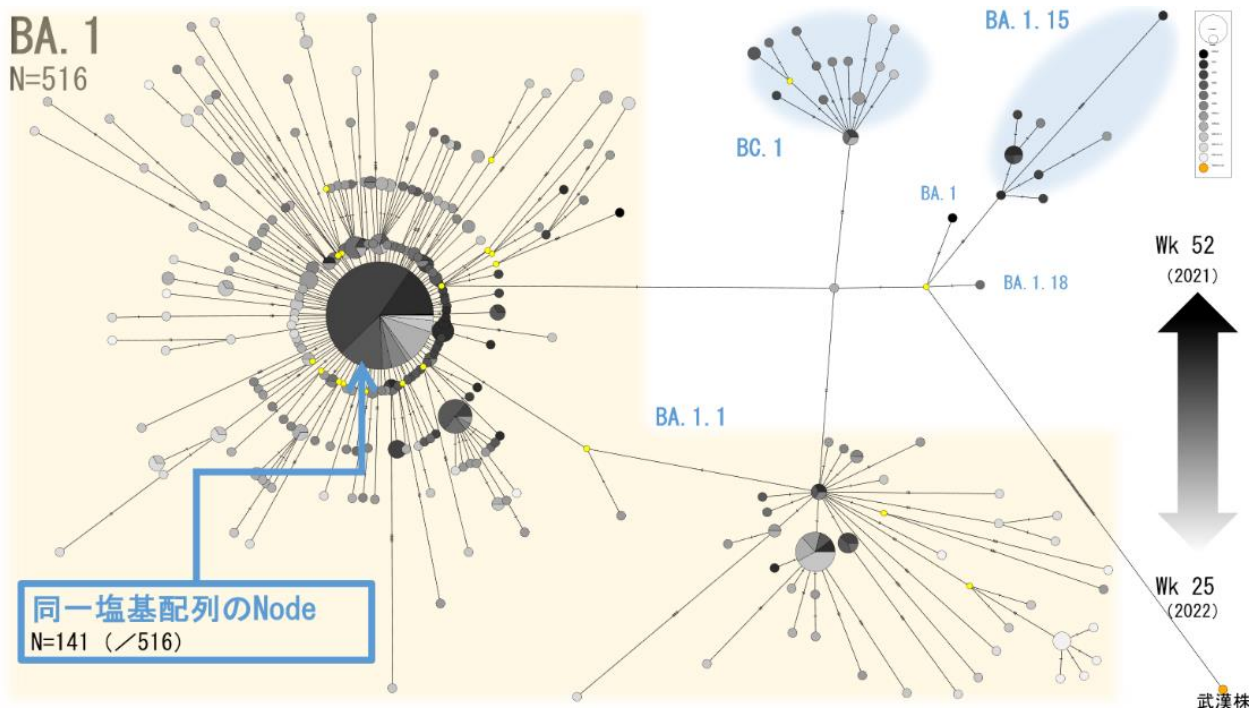


Fig. 6 栃木県内におけるBA.1系統の時系列ハプロタイプネットワーク図

BA.1系統のハプロタイプネットワーク図をみてみると、対象となる516株のうち約1/4に相当する141株がひとつのNodeを形成しており、そのNodeは様々な数週で構成されていることが読み取れる (Fig. 6)。このことは、最初に栃木県内に流入してきたBA.1系統株と同一塩基配列の株が、長期間に渡って変異することがないまま、感染リンクを維持していたことを表している。その後、この大きなNodeを基点として、少しずつ変異を繰り返しながら感染が拡大していったことがわかる。検出株としてはBA.1.1系統が大半を占めていて、遺伝的には比較的近縁の株が流行したといえる。また、一般にオミクロン株は従来株と比較して潜伏期間が短く、免疫逃避性の上昇などの形質の変化も著しいとされており、栃木県内においてもデルタ株からBA.1系統への置き換わりが急速に進んだと思われる。

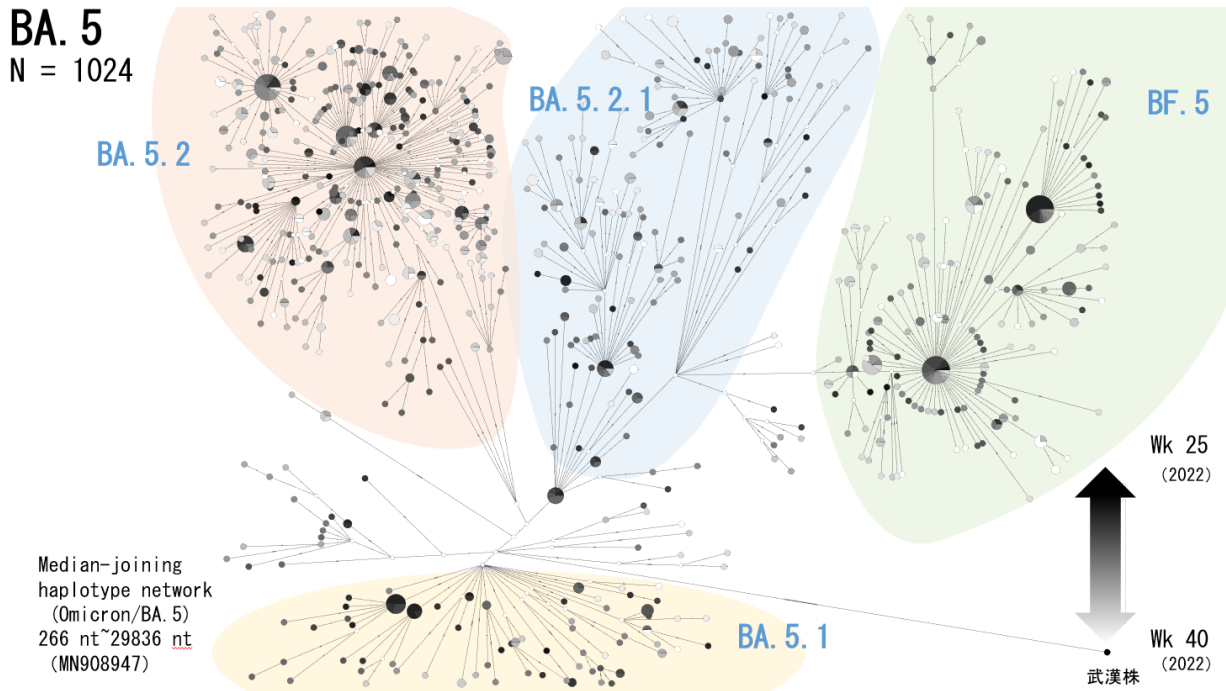


Fig. 7 栃木県内におけるBA.5系統の時系列ハプロタイプネットワーク図

一方、BA.5系統のハプロタイプネットワーク図では、BA.1系統のような大きなNodeは認められず、BA.5.1、BA.5.2、BA.5.2.1、BF.5の4つの系統がほとんどを占めており、時系列もランダムで、それぞれの亜系統が同時多発的に流行していたことがわかる (Fig. 7)。このことは、栃木県内へ同時期に多様な亜系統株が一斉に流入し、それぞれの亜系統が各々に変異しながら感染拡大を引き起こしたことを示唆している。また、このハプロタイプネットワーク図においてBA.1系統は約26週間 (2021年12月～2022年6月)、BA.5系統では約16週間 (2022年6月～10月) のデータであるが、BA.5系統の対象株数はBA.1系統の対象株数の約2倍にのぼり、BA.5系統が栃木県内で非常に急速に、そして大規模に感染拡大を引き起こしたことが示唆される。

4 考察

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、BA.5の順に推移した。新たな変異株の出現が大流行を引き起こす要因となることが示唆された。そのため、栃木県内で検出された株について、全ゲノム解読し変異株の発生動向を把握しておくことは極めて重要である。

2023年5月現在、栃木県内ではBA.5系統が減少し、XBB系統 (2種類のオミクロン株の組換え体) が増加傾向にある。XBB系統とその亜系統のうち、XBB系統とXBB.1.5系統においては中和抗体からの免疫逃避が起こる可能性について、BA.5系統よりも高いとされており、ワクチンによる感染予防効果が低下する可能性が示唆されている⁹⁾。こうした背景がある中、5類感染症への位置づけ変更に伴い、様々な制限が緩和されることで人々の往来が活発になってきている。さらに、これまでの全数把握に代わり定点医療機関からの報告に限定されるため、感染状況について、従来のように正確に把握することがより困難となる。そのため、変異株の発生動向の監視に加え、病原体の病原性や伝播性、対象となる集団の免疫獲得状況、病床使用率など様々な指標を組み合わせた、より重層的なサーベイランスが必要になるとと思われる。

5 謝辞

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、栃木県感染症対策課、栃木県内の各健康福祉センター、民間検査機関など、COVID-19 対策の業務に携わる全ての方々に、心より深謝いたします。

6 参考文献

- 1) COVID-19 Dashboard (<https://covid19.who.int/>) Accessed at 19th May 2023.
- 2) 栃木県における新型コロナウイルス感染症の発生状況および検査状況について (<https://www.pref.tochigi.lg.jp/e04/welfare/hoken-eisei/kansen/hp/coronakensahasseiyoukyou.html>) Accessed at 19th May 2023.
- 3) 新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Qiagen 社 QiaSEQ FX 編、Oxford Nanopore Mk1c&NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編 (国立感染症研究所病原体検出マニュアル).
- 4) Pangolin COVID-19 Lineage Assigner (<https://pangolin.cog-uk.io/>).
- 5) Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>).
- 6) Katoh K *et al.*, MAFFT multiple sequence alignment software version 11: improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol*, 30, 772-780, 2013.
- 7) Tamura K *et al.*, MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027, 2021.
- 8) Leigh, JW *et al.*, PopART: Full-feature software for haplotype network construction, *Methods Ecol Evol*, 6, 1110-1116, 2015.
- 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 27 報) 2023 年 4 月 21 日 9:00 時点 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/12000-sars-cov-2-27.html>).

