

愛媛県で検出された新型コロナウイルスの全ゲノム解析について

岩城洋己 中西千尋 山下育孝 河瀬曜 豊嶋千俊*¹ 松本祐輔*²
田所正子*² 林恵子*² 青木紀子 阪東成純*³ 滝山広志 四宮博人

Keywords : SARS-CoV-2, 変異株, 次世代シーケンサー, 全ゲノム解析

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2:Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)は、新規変異株の出現とそれによる感染の流行を繰り返し、2022年現在も世界的流行(パンデミック)状態にある。国は感染経路の推定、新規変異株の監視と動向調査のため自治体主体の次世代シーケンサー(NGS:Next Generation Sequencer)を用いた全ゲノム解析体制整備を進めてきた。今回、2020年3月から2022年12月までに愛媛県で検出され、全塩基配列を確定した2434検体の解析を実施し、愛媛県における系統分類別の流行動向を評価した。その結果、愛媛県におけるSARS-CoV-2変異株の流行は、全国の流行と同様の傾向を示したが、新規変異株の検出は全国と比較して1か月ほど遅れる傾向があった。全ゲノム解析に基づく分子疫学解析の例を示すと、2021年7月に発生した二つの学校クラスター及び別の学校関係者から同一の塩基配列株が検出されたことから、県内のデルタ株流行初期において、学校関係者を介した感染の拡大があった可能性が示唆された。また、今後に加え、新規の変異株を察知し次代の流行株の拡大を防止するという観点からも、ゲノム解析は極めて重要である。

はじめに

2019年12月上旬に中華人民共和国湖北省武漢市で新型コロナウイルス (SARS-CoV-2:Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)感染者が初めて確認された。その後日本国内においても感染者が発生し¹⁾、愛媛県においても2020年3月に感染者が確認された。SARS-CoV-2は新規変異株の出現とそれによる感染の流行を繰り返し、2022年現在も世界的流行(パンデミック)状態にある。国は感染経路の推定、新規変異株の監視と動向調査のため自治体主体の次世代シーケンサー(NGS:Next Generation Sequencer)を用いたゲノム解析体制整備を進め、本県においても2021年7月から、当所がゲノム解析を実施してきた。今回、本県のゲノム解析から得られた知見について報告する。

材料と方法

1 解析対象

2020年3月から2022年12月に、当県の行政検査でSARS-CoV-2陽性となった患者検体(鼻咽頭ぬぐい液、唾液、咽頭ぬぐい液等)のうち、2020年3月から2021年6月に国立感染症研究所(以下、感染研)で全塩基配列を確定した282件及び、2021年7月から12月に当所で全塩基配列を確定した2152件の配列データを解析対象とした。

2 全ゲノム配列の解読

SARS-CoV-2陽性検体からのRNA抽出にはQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN社)を用いた。抽出RNAを用いて、感染研が公開する糸川ら²⁾の新型コロナウイルスのゲノム解析プロトコルに準じて解読した。NGSとしてMiseq (illumina社)を使用し、感染研が提供する解析サーバー(COG-JP)を用いて配列の構築を行った。

3 系統分類と全国との比較

SARS-CoV-2の系統の判定にはPANGOLIN (ver.4.13)とNext Clade CLI (ver.2.7)プログラムを使用しPango LineageとNext Cladeの決定を行い、両判定結果を用いて分類を行った。また、感染研HPで公開されている新型コロナウイルスゲノムサーベイランスによる国内の系統別検出状況のデータ³⁾を用いて同様の分類を行い、全国と愛

愛媛県立衛生環境研究所 東温市見奈良1545番地4

*1 愛媛県宇和島保健所

*2 松山市保健所(松山市萱町6丁目30-5)

*3 愛媛県保健福祉部健康衛生局業務衛生課

表1 愛媛県の各流行波におけるゲノム解析数と陽性者に対する割合

流行波	本研究での流行波の区分	ゲノム解析数/陽性者数(割合)	配列決定
第1波	2020年3月～6月	54/82 (65.9%)	国立感染症研究所
第2波	2020年7月～10月	24/32 (70.6%)	
第3波	2020年11月～2021年2月	44/947 (4.6%)	
第4波	2021年3月～6月	160/1695 (9.4%)	
第5波	2021年7月～12月	337/2664 (12.7%)	愛媛県立 衛生環境研究所
第6波	2022年1月～6月	825/38043 (2.2%)	
第7波	2022年7月～9月	678/117645 (0.6%)	
第8波	2022年10月～12月	312/90610 (0.3%)	
総計		2434/251720 (0.9%)	

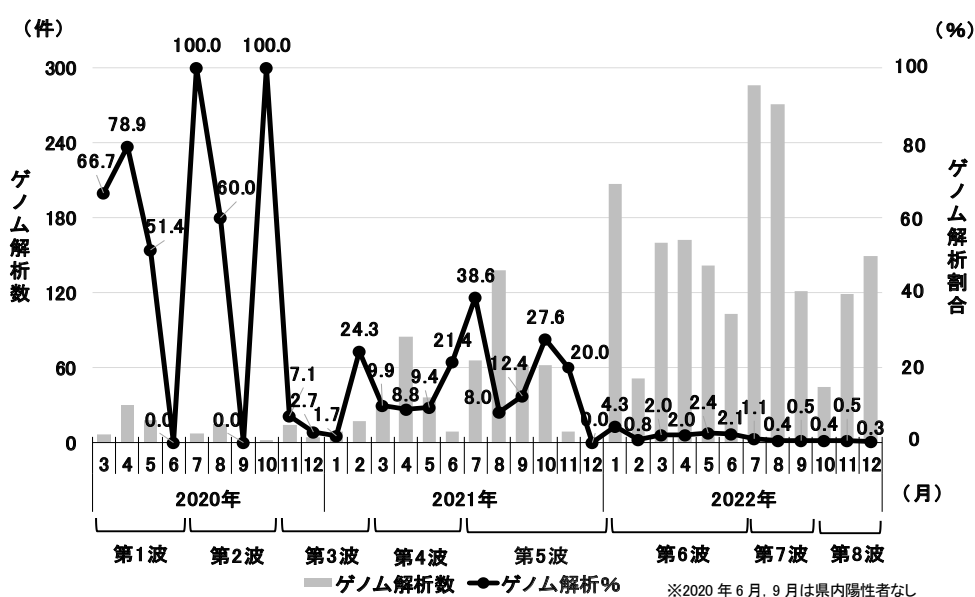


図1 SARS-CoV-2 ゲノム解析数と県内陽性者に対する解析割合

表2 愛媛県で検出された SARS-CoV-2 株の系統分類と検出数

Next Clade ()内は Pango Lineage	検出数	Pango Lineage Ver.4.1.3 (県内で検出されたもの)	主な検出時期
19B (A)	1	A	2020年3月の初確認事例
20A (B.1)	2	B.1	2020年3月～5月
20B (B.1.1～)	156	B.1.1 B.1.1.48 B.1.1.214 B.1.1.284 B.1.1.285 R.1	2020年7月～2021年3月
20G (B.1.2)	1	B.1.2	2021年5月
Alpha (B.1.1.7)	140	B.1.1.7	2021年3月～6月
Delta (B.1.617.2～)	323	AY.29 AY29.1 AY29.2	2021年7月～11月
Omicron (BA.1～)	444	BA.1.1 BA.1.1.2 BA.1.15 BC.1	2022年1月～3月
Omicron (BA.2～)	502	BA.2 BA.2.10 BA.2.10.2 BA.2.12 BA.2.13.1 BA.2.18 BA.2.24 BA.2.29 BA.2.3 BA.2.3.1 BA.2.3.11 BA.2.3.13 BA.2.3.18 BA.2.56.1 BA.2.65	2022年4月～6月
Omicron (BA.5～)	815	BA.5 BA.5.1 BA.5.1.16 BA.5.1.17 BA.5.1.2 BA.5.1.22 BA.5.1.23 BA.5.1.5 BA.5.2 BA.5.2.1 BA.5.2.12 BA.5.2.18 BA.5.2.19 BA.5.2.20 BA.5.2.21 BA.5.2.22 BA.5.2.26 BA.5.2.28 BA.5.2.3 BA.5.2.6 BA.5.3.1 BA.5.5 BA.5.6.2 BE.1.1 BE.4 BF.13 BF.21 BF.22 BF.27 BF.3 BF.5 BF.7 BK.1	2022年7月～12月
Omicron(BQ.1～)	9	BQ.1.1	2022年11月～12月
Omicron (BA.2.12.1)	32	BA.2.12.1	2022年5月～7月
Omicron (BA.2.75～)	9	BA.2.75 BN.1 BL.1	2022年8月,11月～12月

媛県の流行系統推移の比較を行った。

4 ハプロタイプネットワーク解析

ハプロタイプネットワークの作成にはネットワーク作成ソフトウェアPoPart (ver.1.7)を使用し、保健所等の聞き取り情報などの実地疫学情報と照合し解析を行った。

5 本研究における感染流行波の区分

本研究では愛媛県における感染流行波について表1に示す月単位で区分した。

結果

1 各流行波におけるゲノム解析数と陽性者に対する割合

各流行波における当所のゲノム解析数と陽性者に対する割合を表1に示した。また、その解析割合の月別のグラフを図1に示した。

感染研に解析を依頼していた第1波から第4波においては、平均して月に20件ほどの解析数であったが、陽性者数が少なかったため解析割合は高かった。2021年7月から当所での解析が始まり、第5波以降は解析数が増加した。また、デルタ株やオミクロン株など新規の変異株の流行が拡大した時期には、監視強化のため解析数が増加し、特にBA.5系統が流行の兆しをみせ始めた2022年7月には286件のゲノム解析を実施した。第6波以降、感染者の急増に伴い、平均して月に150件ほどに解析数は増加したものの、陽性者に対する割合は低下した。

2 県内の各流行波におけるSARS-CoV-2の系統分類別検出数と推移

ゲノム配列データ2434件について、Next Clade (ver.2.7)とPango Lineage (Ver.4.1.3)の系統に従って表2に示すとおり分類し、それらの月別のゲノム解析数と検出割合を図2に示した。また、全国のゲノム解析数と系統別の検出割合を図3に示した。

(1) 2020年3月から5月(第1波)

本県で3月にSARS-CoV-2が初確認された検体からは武漢株の19B系統群(A系統)が検出され、以降、武漢株に近縁な20A系統群(B.1系統)が2件検出された。しかし、第1波において本県で主に流行した系統は、ウイルスの細胞感染に関与するスパイクタンパク質をコードする領域(スパイク領域)にD614G変異を有する欧州株の20B系統群(B.1.1系統)であった。

(2) 2020年7月から2月(第2波及び第3波)

第2波と第3波においては第1波の欧州株のB.1.1系統から派生した子系統(B.1.1.214, B.1.1.284等)が主流であった。また、2020年12月から全国的に確認されたスパイ

ク領域にE484K変異をもつR.1系統が本県においても2021年1月採取の検体から検出され始め、その後2021年5月までに計43件が検出された。

(3) 2021年3月から6月(第4波)

海外籍の患者から初確認された、スパイク領域にN501Y変異を有するアルファ株(B.1.1.7系統)の割合が2月から増加し、3月には全体に占める割合が7割を超え、6月に検出された系統はすべてアルファ株(B.1.1.7系統)となり、8月までに計140件が検出された。

(4) 2021年7月から11月(第5波)

スパイク領域にL452R変異を有する変異株であるデルタ株(B.1.617.2系統)が流行し、計323件が検出された。本県では主にB.1.617.2系統が細分化されたAY.29系統とその子系統が検出された。

(5) 2022年1月から9月(第6波及び第7波)

感染力と免疫逃避能に関係するスパイク領域に30以上の変異を有するB.1.1.529系統を親系統とするオミクロン株が流行した。本県で初確認されたオミクロン株は、1月に海外渡航歴のある患者検体から検出されたBA.2系統であったが、第6波の前半(1月から3月)においてはBA.1系統が流行した。3月からはBA.2系統の検出が増加し、5月には全体に占める割合が9割を超え、流行系統の入れ替わりが起こった。さらに7月にはBA.5系統が急増し、8月には流行の主流となった。一方、5月から8月にかけてスパイク領域にL452Q変異を有し免疫逃避能の上昇が示唆されていたBA.2.12.1系統⁴⁾が32件検出されたが、主な流行系統とはならなかった。

(6) 2022年10月から12月(第8波)

第7波に続きBA.5系統が主に流行した。長期間に渡る感染流行により、BA.5系統の亜系統が多数検出されるようになった。さらに、11月頃より、BA.2系統及びBA.5系統のスパイク領域の受容体結合部位(RBD:receptor binding domain)に多数の変異が追加され、免疫逃避能や抗原性の変化が懸念されるBA.2.75系統⁵⁾及びBQ.1系統⁶⁾の検出が認められた。

3 ハプロタイプネットワークを用いた分子疫学解析

2021年7月～10月に検出、全塩基配列が確定されたデルタ株254株間の変異の関係を表すハプロタイプネットワークを各保健所管内別に色分けし、クラスター事例毎に図示した(図4)。

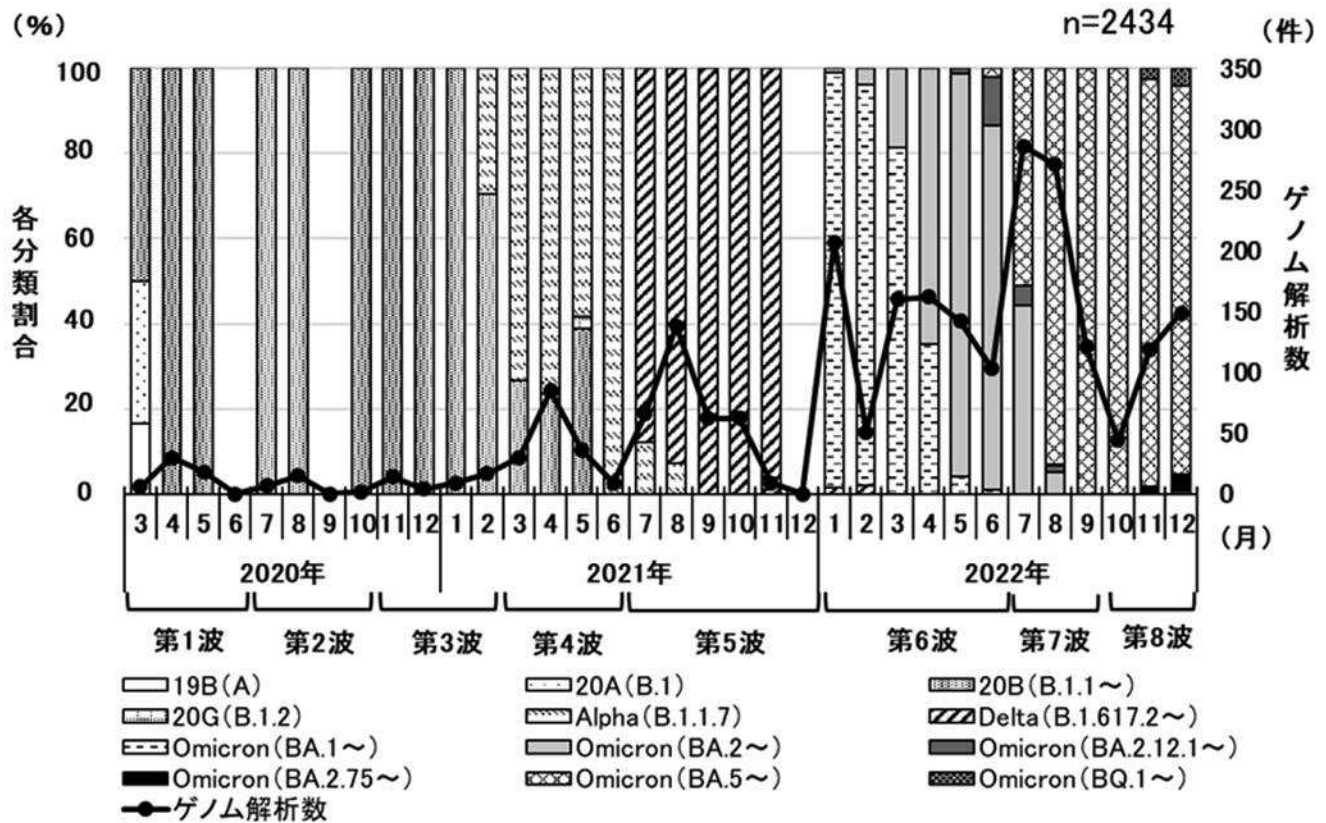


図2 SARS-CoV-2 ゲノム解析数と各系統分類割合 (愛媛県)

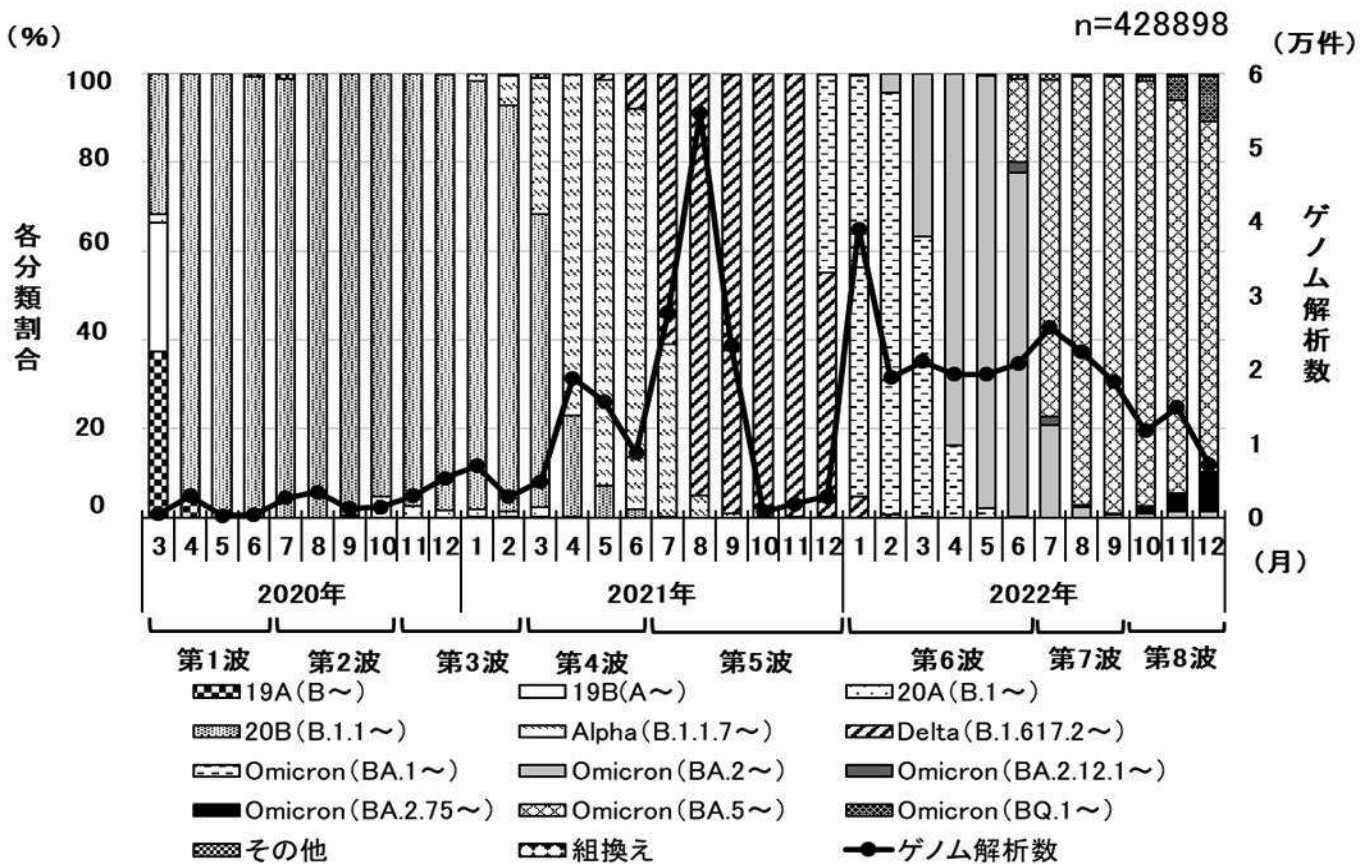


図3 SARS-CoV-2 ゲノム解析数と各系統分類割合 (全国)

2021年7月に発生した西条保健所管内の学校クラスター1と松山市保健所管内の学校クラスター2及び他2学校の関係者から塩基配列が同一の株が検出され、これらの学校関係者間の感染経路を推定するうえで重要なデータとなった。

考察

第1波～第5波においては、保健所が徹底した疫学調査を実施できたことから、県内の陽性者のほぼ全ての検体を当所に集積し、ウイルス量が十分なものについてはゲノム解析を行うことが可能であった。しかし、第6波以降は陽性者の急増に伴い、保健所の業務重点化や、民間検査会社と医療機関による病原体検査が主となったことにより、ゲノム解析対象となる陽性検体を収集しにくくなった。そのため、国が定めるSARS-CoV-2ゲノムサーベイランスの目標解析数である陽性者の5%～10%⁷⁾の実施は難しくなった。

愛媛県におけるSARS-CoV-2流行株の系統の推移は全国の動向と同様であった。また、主な流行系統の変異株の検出は、第6波において2022年1月に海外渡航歴のある患者検体から初めて確認されたBA.2系統を除き、

全国と比較して1か月程度遅い傾向があった。このことから、各系統の変異株は県外である程度流行した後、愛媛県に流入している可能性が示唆された。

第1波から第3波の流行はスパイク領域にD614G変異を有する欧州株によるものであり、この変異は細胞結合能の増大と関係し⁸⁾、現在の流行株でも継承されている。第4波以降の流行には新たな変異株が関与しており、第4波はN501Y変異を獲得したアルファ株、第5波はL452R変異を獲得したデルタ株による流行であった。N501Y変異株では感染力の増加⁹⁾が、L452R変異株では免疫逃避能の増大¹⁰⁾が、それぞれ報告されており、流行拡大の要因の一つと推察された。さらに、感染力と免疫逃避能に影響を及ぼすと考えられるスパイク領域に上記の2変異を含めた様々な変異が蓄積されたオミクロン株とその派生系統が第6波以降の流行の主流となった。また、第6波から第8波にかけて、感染者の顕著な増加と流行期間の長期化により、県内においてもBA.2とBA.5の亜系統が多岐に渡って検出された。

第4波のアルファ株以降の主な流行系統では、宿主細胞表面の受容体であるアンギオテンシン転換酵素2(ACE2:angiotensin-converting enzyme 2)に結合する部位

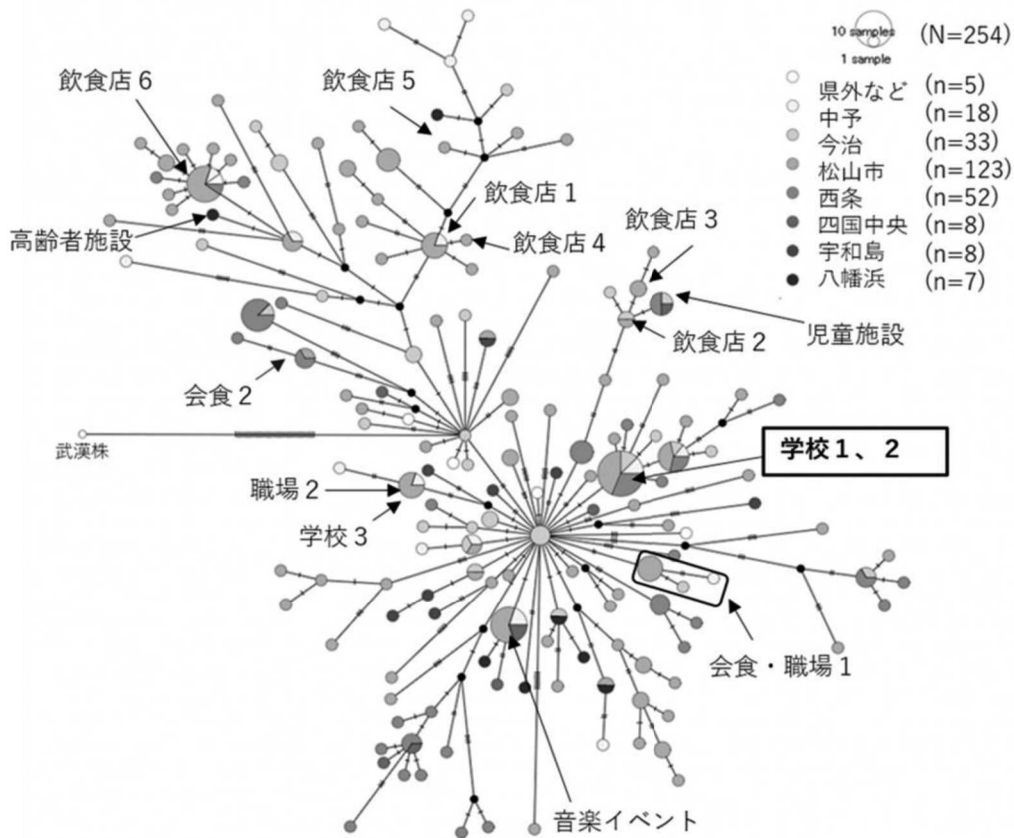


図4 管轄保健所別デルタ株ハプロタイプネットワーク(クラスターを图示)

(RBD) に変異が追加されている^{4-6,9,10}。中和抗体薬やワクチン接種により生体内で誘導される抗体も ACE2 と RBD の結合を阻害することで作用するため、RBD に変異が追加され、抗体の阻害活性が低下することで免疫逃避能が増大し¹¹、感染拡大の要因となったと推察される。

ゲノム解析に基づく分子疫学解析によって、第 5 波において互いに別事例とされていた学校クラスター 2 事例とその他の学校関係者から検出されたデルタ株が同一株であることが判明し、県内のデルタ株の流行初期において学校関係者を介した感染拡大があった可能性が示唆された。

結語

NGS を用いた全ゲノム解析により、県内で流行した SARS-CoV-2 系統を詳細に解析することが可能となった。疫学情報と組み合わせた感染リンク追跡により、クラスター対策や濃厚接触者調査において必要な情報を行政機関や保健所に提供でき、感染拡大防止において非常に有用であったが、第 6 波以降は同時多発的な感染者の増加や保健所の業務重点化などにより感染リンクの追跡が難しくなった。一方、ワクチン接種や治療薬の出現によってウイルス進化に選択圧がかかっている状況であり、免疫逃避能や薬剤耐性と関連する新規の変異を獲得しやすい状況にあるため、新規の変異株の察知と次代の流行株の拡大防止を目的とするサーベイランスとしてのゲノム解析は極めて重要である。

謝辞

SARS-CoV-2 ゲノム解析において多大なるご支援をいただ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および検体採取や疫学調査にご協力いただいた県内の医療機関や保健所の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省HP: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(1例目)
https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_08906.html
- 2) Itokawa K. *et al.* : PLOS ONE 15 (9): e0239403 (2020)
- 3) 国立感染症研究所HP:新型コロナウイルス ゲノムサーベイランスによる国内の系統別検出状況
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10745-cepr-topics.html>
- 4) Cao Y. *et al.* : Nature (608). 593- 602 (2022)
- 5) Cao Y. *et al.* : Cell Host & Microbe 30 .1527-1539 (2022)
- 6) Cao Y. *et al.* : Nature (614). 521- 529 (2023)
- 7) 令和4年9月21日付け 健感発0205第4号 厚生労働省健康局結核感染症課長通知:新型コロナウイルス感染症の積極的疫学調査におけるゲノム解析及び変異株PCR 検査について(要請)
- 8) Seiya O. *et al.* : Nature Communications (12) 848. (2021)
- 9) Yang L *et al.* : Nature 602,294-299(2022)
- 10) V Tchesnokova *et al.* : J Clin Microbiol. 59 (11) , 1-10 (2021)
- 11) Long M. *et al.* : Front Mol Biosci. 8(671633),1- 9 (2021)

Whole Genome Analysis of SARS-CoV-2 Variants Detected in Ehime Prefecture, Japan

Hiromi IWAKI, Chihiro NALANISHI, Yasutaka YAMASHITA, Akira KAWASE,
Chitoshi TOYOSHIMA, Yusuke MATSUMOTO, Shoko TADOKORO, Keiko HAYASHI,
Noriko AOKI, Naritoshi BANDO, Hiroshi TAKIYAMA, Hiroto SHINOMIYA

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is still in a global pandemic state in 2022 due to the emergence of new variants and the resultant increase in the number of infected people. The national government has been promoting the development of a whole genome analysis system using Next Generation Sequencers (NGS), which is mainly conducted by local governments, to estimate the route of infection and to monitor and investigate new variants. In this study, we analyzed 2434 samples detected and fully sequenced in Ehime Prefecture from March 2020 to December 2022, and evaluated the prevalence trend by phylogenetic classification in Ehime Prefecture. As a result, the prevalence of SARS-CoV-2 variants in Ehime Prefecture showed the same trend as that in Japan, but the detection of new variants tended to be delayed by about one month compared with that in Japan. An example of molecular epidemiological analysis based on whole-genome analysis shows that the same nucleotide sequence strains were detected in two school clusters and people of other schools in July 2021, suggesting the possibility of spread of infection through school personnel and students in the early stages of the Delta variant outbreak in the prefecture. Genome analysis is also extremely important from the viewpoint of detecting new variants and preventing their spread in preparation for the future.