

東京都内で分離された新型コロナウイルスの

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（2020年6月～2021年5月）

浅倉 弘幸^a, 吉田 勲^b, 熊谷 遼太^a, 小林 甲斐^b, 長谷川 乃映瑠^b, 三宅 啓文^a, 藤原 卓士^a, 長谷川 道弥^a,
林 真輝^a, 永野 美由紀^a, 根岸 あかね^a, 山崎 貴子^a, 河上 麻美代^a, 矢尾板 優^a, 黒木 絢士郎^a,
北村 有里恵^a, 加來 英美子^a, 磯貝 まや^a, 森 功次^a, 原田 幸子^a, 鈴木 愛^a, 糟谷 文^a, 天野 有紗^a,
小杉 知宏^a, 林 志直^a, 長島 真美^c, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^c

2019年12月に中国武漢で初めて新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の患者が確認されてから、現在も世界各地で新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による流行が続いている。COVID-19の世界的流行に伴い、ウイルスの性質を変化させる変異株の出現が相次いで報告されている。今回、東京都内におけるSARS-CoV-2の変異の調査を目的に、2020年6月から2021年5月までにVero系細胞を用いて分離培養されたSARS-CoV-2の分離株110株を次世代シーケンサーを用いて解析し、武漢で報告された参照株と比較した。第2波（2020年7月から8月）から第3波（2020年12月から2021年1月）では、欧州からの帰国者より広まった第1波（2020年3月から5月）から派生した日本固有の系統であった。また、2021年3月以降の第4波からは海外で流行した株（VOC: Variant of Concern, VOI: Variant of Interest）が次々と都内でも分離されている。

キーワード： SARS-CoV-2, 分離培養株, COVID-19, 変異株, 次世代シーケンサー, 系統樹解析

はじめに

2019年12月に中国湖北省武漢市で発生した2019新型コロナウイルス（以下、SARS-CoV-2）による新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は現在も世界的流行（パンデミック）が続いており、未だ終息に至っていない。東京都内においてもSARS-CoV-2感染者は連日報告されており、東京都の累計感染者数は2021年6月1日現在、161,426人となっている¹⁾。

SARS-CoV-2は1か月で2か所程度変異が入ると推定されており²⁾、特にスパイク領域などにアミノ酸の変化を伴う変異には、感染性増強や免疫逃避の可能性も示唆されている。そのため、SARS-CoV-2のゲノム解析は世界各地で盛んに行われ、2021年6月1日現在200万株以上の配列が登録されている³⁾。現在世界中で検出されているSARS-CoV-2は武漢で報告された参照株から多数の変異が生じている。本研究では、前報⁴⁾に続き都内で発生したSARS-CoV-2の分離培養株を次世代シーケンサー（NGS）で解析を行い、変異の状況把握を行ったのでその結果を報告する。

実験方法

1. 材料

2020年6月1日から2021年5月31日に都内の医療機関よりCOVID-19疑い例およびSARS-CoV-2の変異株の調査として搬入された臨床検体（咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀

痰、唾液）からVeroE6細胞またはVeroE6/TMPRSS2細胞を用いて分離されたウイルス株110株をNGSによる全ゲノム解析の対象とした。

2. ウイルス分離とNGS解析

各種臨床検体からSARS-CoV-2をVeroE6細胞またはVeroE6/TMPRSS2細胞で培養した。培養上清からQIAmp Viral RNA mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより分離細胞中のSARS-CoV-2の増殖を確認後、ライブラリー作成に用いた。NGSのライブラリー作成にはNEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina（NEB）を用い、MiSeq（Illumina）を使用してデータを取得した。得られたデータはCLC genomic work bench（CLC bio）を用いて参照株へマッピングを行い、全長配列を取得した。参照株にはWuhan-Hu-1（NC_045512.2）を用いた。取得した配列はPangolin（Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages）による系統分類をwebサイト（<https://pangolin.cog-uk.io/>）で行った（系統名は2021年7月時点のものである）。また、遺伝子解析ソフトMEGA7（<http://www.megasoftware.net/index.php>）を用いて系統樹解析を行った。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
^c 東京都健康安全研究センター微生物部

結果および考察

1. NGSによる配列決定と変異の探索

SARS-CoV-2の分離培養110株についてNGSにてほぼ全長配列（約29.9kb）を取得することができ、全長を取得できた110株についてはDDBJ/GenBankに登録を行った。

取得したSARS-CoV-2の全長配列には多数の変異が認められた（図1）。参照株（NC_045512.1_Wuhan-Hu-1）からおおよそ1年後に分離されたTKYT66767_2020（2020年12月22日搬入）やTKYT76080_2021（2021年1月15日搬入）では変異数が20前後となり、SARS-CoV-2の計算された変異速度である2か所/月に当てはめるとほぼ推定された塩基変異数と同様の変異数となった。しかしながら、2021年1月以降に分離された変異株（B.1.1.7：アルファ株、B.1.617.2：デルタ株、B.1.617.1：カッパ株）などでは、塩基変異数が30以上認められ、推定数より多くなった。これらの株は特にスパイク領域（S領域）に変異が集中していたことが明らかになった（図1）。

これらの変異株は、スパイク領域内の宿主細胞との結合部位であるRBD（Receptor Binding Domain）におけるアミノ酸の変化を伴う変異の中で、ウイルスの性質が変化した株で、E484K、N501Y、L452Rの変異は特に国際的に懸念されている変異である。中でもE484Kは免疫逃避効果があると考えられており⁵⁾、アルファ株に見られるN501Y変異では従来株より感染性が高まったとの報告がある⁶⁾。デルタ株およびカッパ株はL452R変異があり、カッパ株はさらにE484Qも存在しており、これらの変異によりアルファ株よりさらに感染性が高いことが推定されている⁷⁾。WHOではアルファ株やデルタ株はVOC（Variant of Concern）として「懸念される変異株」に、また、カッパ株はVOI（Variant of Interest）「注目すべ

き変異株」に指定している（2021年7月時点）。

今回解析した分離株の中には、欠失やストップコドンへ変化する変異が認められた（表1）。アルファ株やデルタ株にはスパイク領域に欠失が見られた。アルファ株のH69-V70delは免疫逃避に寄与しているという報告もあることから⁸⁾、これらスパイク領域の欠失は免疫逃避や感染性向上の要因となっていると考えられる。

ORF7b領域においてはTKYE641680_2020のように途中ストップコドンへ変化する変異（E3stop）が見られ、この変異によりORF7bからコードされるアミノ酸数は44から2となり、蛋白としての機能は喪失したと考えられる分離株が存在した。SARS-CoV-2のORF7b領域と高い相同性があるSARS-CoVでは、そのORF7b領域が膜貫通蛋白をコードしており、ウイルスの構造蛋白の一部と考えられているが、SARS-CoVの継代培養によりORF7b領域に29ヌクレオチドの欠失が見られたため、ORF7b領域は増殖に関与しないのではないかと報告がある⁹⁾。また、SARS-CoV-2のORF7b領域においても同様に欠失例の報告¹⁰⁾もあることから、ORF7b領域はウイルスの増殖に大きな影響を与えていないと予想された。このことから、今回のE3stopによる蛋白としての機能の喪失は、ウイルスの増殖に大きな影響を与えないと予想された。

ORF8領域の途中でストップコドンへ変化する変異（Q27stop）がアルファ株全てで認められた。ORF8領域のストップコドンへの変異は他にも複数の報告があり、ORF8領域は変異の発生が多いホットスポットと考えられている^{11,12)}。ORF8の欠失により、臨床症状が軽度になり、また、感染性が向上するという推察もある¹¹⁾ことから、アルファ株はスパイク領域の変異に加え、ORF8領域の欠失も感染力の向上に寄与していると考えられる。

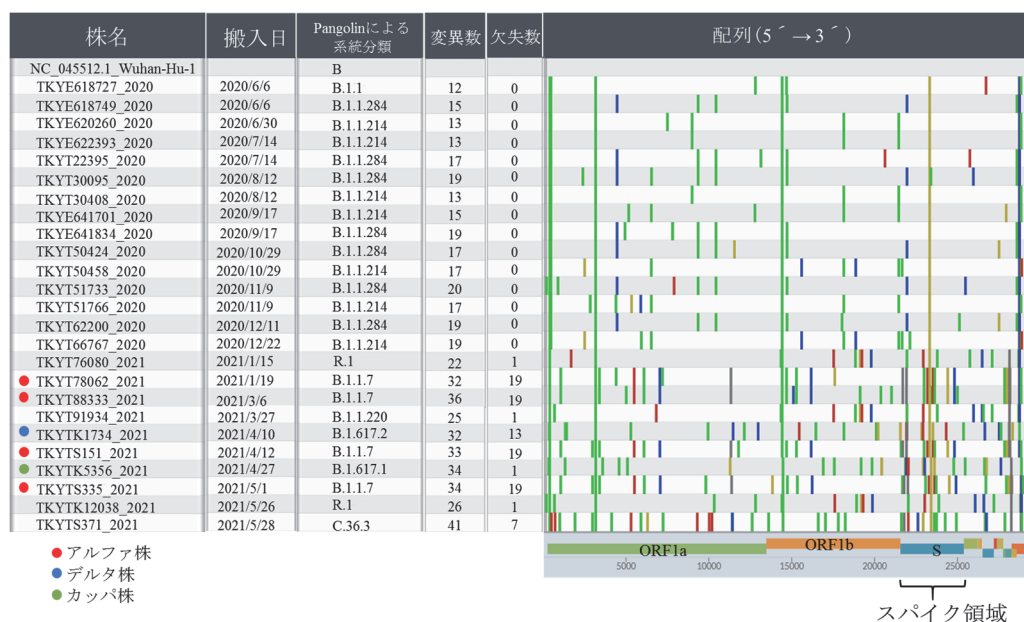


図1. SARS-CoV-2分離株全長配列の変異俯瞰図（一部）
Next clade (<https://clades.nextstrain.org/>)にて作成

表1. SARS-CoV-2分離株で見られた変異
(1塩基変異を除く)

領域	変異箇所	アミノ酸変異	変異が見られた系統もしくは株名
ORF1a	11888-11296del	S3675-F3677del	B.1.1.7, B.1.617.2
S	21765-21770del	H69-V70del	B.1.1.7, C.36.3
	22029-22034del	E156-R158del	B.1.617.2
	21992-21994del	Y144del	B.1.1.7
ORF7b	G27762T	E3stop	TKYE641680_2020
ORF8	C27972T	Q27stop	B.1.1.7
N	28271del		R.1, B.1.1.7, B.1.617.1, B.1.617.2, C.36.3
3'-UTR	29722-29767del		TKYT51546_2020
	29677insT		TKYT61323_2020

ヌクレオカプシド (N) 領域の上流にある28271delは、R.1, B.1.1.7, B.1.617.1, B.1.617.2, C.36.3と多くの変異株で認められた。非コード領域の欠失であるが、N領域およびN領域内のORF9bの翻訳効率に影響し、感染に深く影響すると考えられている¹³⁾ことから、感染に有利に働く変異であると推察される。

また、3'-UTRにおいて1塩基挿入 (TKYT61323_2020) と46塩基欠失 (TKYT51546_2020) が認められた。SARS-CoV-2の3'-UTRは他のコロナウイルスとも高い相同性があり、ウイルスの複製に重要な部位と考えられている¹⁴⁾。3'-UTR内の3'ステムループII様モチーフ (s2m) に宿主因子が結合し、防御機構が作用すると考えられていることから、3'-UTRにおける変異によりウイルスが宿主の防御機構を回避するようになったことで増殖効率が向上する可能性が示唆^{15,16)}されており、3'-UTRにおける変異にも着目する必要がある。

現在、世界各地でCOVID-19の流行が続いており、変異株は次々と出現し、今回の分離株の中でアミノ酸の変化を伴う1塩基変異や欠失も多数確認している。VOCなどの懸念される変異株は、感染性や免疫逃避に最も重要な部位であるスパイク蛋白に重点が置かれている。しかしながら、第2波で主に検出された株では、ORF1a領域のメインプロテアーゼをコードする部位の変異によって病原性が弱まったため、第2波では重症者や死者が少なかったという考察がなされている¹⁷⁾。よって、SARS-CoV-2の性質の変化については、スパイク領域以外の部位の変異にも注目する必要がある。そのためにはウイルス分離とNGSによる全長の解析は有効な手段である。

SARS-CoV-2については未だ不明なことが多く、特に新たな変異に対する感染性の変化と流行の関連性や感染細胞内の複製機構、免疫逃避などの評価には分離株を用いた試験が必要である。

2. 分離株の系統分類

SARS-CoV-2の分離培養110株についてPangolinによる系統分類を行った (表2)。2020年6月から7月にかけては、B.1.1系統およびB.1.1.214系統とB.1.1.284系統の分離株を得た。第2波 (2020年7月～8月) と第3波 (2020年11月

～2021年1月) の検体からはB.1.1.214系統とB.1.1.284系統やR.1系統が、第4波 (2021年3月～) の検体からはB.1.1.7系統、B.1.617.1系統、B.1.617.2系統、C.36.3系統などが分離された (表2)。

2020年3月下旬から5月にかけて国内で初めてCOVID-19の大きな流行が認められた。第1波の流行の主体は、2020年2～3月にかけてイタリアを中心とした欧州で流行していたB.1.1系統であり⁴⁾、欧州からの帰国者により持ち込まれたB.1.1系統 (欧州型) により感染が拡大した。B.1.1系統で認められたスパイク領域のD614G変異により感染性が増強したとされ¹⁸⁾、B.1.1系統から派生したB.1.1.214系統とB.1.1.284系統が国内の第2波、第3波に大きく関わった。どちらも世界での検出数の9割以上が日本由来であることから、日本固有の系統と考えられている¹⁹⁾。

R.1系統の起源は不明であるが、都内では2021年1月中旬から確認され、東日本中心に広まった²⁰⁾。R.1系統はE484K変異を有しており、免疫逃避の可能性が示唆されている。第4波前半の2021年3月～4月では陽性検体中過半数がR.1系統となったが、その後B.1.1.7系統 (アルファ株) に置き換わりR.1系統は減少した²¹⁾。

2020年12月ごろより海外では感染性が増強した変異株の出現が報告され始め、イギリスでは2021年1月初旬をピークとしたアルファ株の流行が報告された⁸⁾。都内では2021年1月にアルファ株が初めて検出された後、第4波 (2021年4月～5月) の主流株となった²¹⁾。その後、イギリスではインドで報告された B.1.617.2 (デルタ株) が増加し、アルファ株と置き換わって主流株となった²²⁾。都内においても2021年4月に初めてデルタ株が検出された後、デルタ株の検出数は増加している。イギリスではデルタ株はアルファ株より感染力が強いと推定されている⁷⁾。

2021年5月には北アフリカからの帰国者よりC.36.3が分離された。このC.36.3系統の株が41箇所の1塩基変異を有しており、今回解析した分離株の中で1塩基変異の数では最も多かった (図1)。英国公衆衛生サービス (Public Health England) によると、C.36.3はイギリスをはじめとする海外の複数国から検出例があり、「VUI (Variant under Investigation: 調査中の変異株)」に指定されている²²⁾。デルタ株やカッパ株と同じく免疫逃避に寄与すると

表 2. SARS-CoV-2 の全長解析に用いた分離株

株名	Accession No	搬入日	Pangolinによる 系統分類	株名	Accession No	搬入日	Pangolinによる 系統分類
TKYE618727_2020	LC573281	2020/6/6	B.1.1	TKYT50842_2020	LC623945	2020/10/29	B.1.1
TKYE618735_2020	LC573280	2020/6/6	B.1.1	TKYT50843_2020	LC623946	2020/10/29	B.1.1
TKYE618749_2020	LC573282	2020/6/6	B.1.1.284	TKYT50844_2020	LC623947	2020/10/29	B.1.1
TKYE618765_2020	LC573273	2020/6/7	B.1.1	TKYT50847_2020	LC632050	2020/11/1	B.1.1
TKYE618779_2020	LC573283	2020/6/7	B.1.1.284	TKYT50850_2020	LC632051	2020/11/1	B.1.1
TKYE618795_2020	LC573274	2020/6/8	B.1.1	TKYT51144_2020	LC632052	2020/11/4	B.1.1
TKYE618796_2020	LC573275	2020/6/8	B.1.1	TKYT51229_2020	LC632053	2020/11/4	B.1.1.214
TKYE618928_2020	LC573276	2020/6/9	B.1.1.284	TKYT51267_2020	LC636480	2020/11/4	B.1.1
TKYE618929_2020	LC573277	2020/6/9	B.1.1.284	TKYT51292_2020	LC633755	2020/11/4	B.1.1.284
TKYE618930_2020	LC573278	2020/6/9	B.1.1.284	TKYT51353_2020	LC636485	2020/11/5	B.1.1.284
TKYE618937_2020	LC573279	2020/6/9	B.1.1.284	TKYT51546_2020	LC643029	2020/11/6	B.1.1.214
TKYE620226_2020	LC573284	2020/6/29	B.1.1.214	TKYT51587_2020	LC632054	2020/11/6	B.1.1.284
TKYE620228_2020	LC573285	2020/6/29	B.1.1.214	TKYT51592_2020	LC633756	2020/11/6	B.1.1.284
TKYE620260_2020	LC573286	2020/6/30	B.1.1.214	TKYT51733_2020	LC638674	2020/11/9	B.1.1.284
TKYT22342_2020	LC593801	2020/7/14	B.1.1.284	TKYT51766_2020	LC633757	2020/11/9	B.1.1.214
TKYT22355_2020	LC593802	2020/7/14	B.1.1.284	TKYT51778_2020	LC636486	2020/11/9	B.1.1.284
TKYE622387_2020	LC593803	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT51806_2020	LC633758	2020/11/9	B.1.1.284
TKYE622388_2020	LC593804	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT51811_2020	LC636487	2020/11/9	B.1.1.284
TKYE622391_2020	LC593805	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT51821_2020	LC636481	2020/11/9	B.1.1.284
TKYE622393_2020	LC593806	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT51924_2020	LC633759	2020/11/9	B.1.1.284
TKYT22395_2020	LC593807	2020/7/14	B.1.1.284	TKYT51927_2020	LC638675	2020/11/9	B.1.1.214
TKYE622411_2020	LC593808	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT61323_2020	LC643030	2020/12/9	B.1.1.214
TKYE622414_2020	LC593809	2020/7/14	B.1.1.214	TKYT61324_2020	LC636482	2020/12/9	B.1.1.214
TKYE624705_2020	LC593810	2020/7/14	B.1.1.284	TKYT61575_2020	LC636483	2020/12/10	B.1.1
TKYE626993_2020	LC606017	2020/8/1	B.1.1.284	TKYT61760_2020	LC638680	2021/12/10	B.1.1.214
TKYE627000_2020	LC593811	2020/8/2	B.1.1.284	TKYT61894_2020	LC638676	2020/12/10	B.1.1.214
TKYE629933_2020	LC593812	2020/8/11	B.1.1.284	TKYT61988_2020	LC638677	2020/12/10	B.1.1.214
TKYE630074_2020	LC593813	2020/8/12	B.1.1.284	TKYT62063_2020	LC638678	2020/12/10	B.1.1.214
TKYE630094_2020	LC593814	2020/8/12	B.1.1.284	TKYT62200_2020	LC636484	2020/12/11	B.1.1.284
TKYT30095_2020	LC593815	2020/8/12	B.1.1.284	TKYT66767_2020	LC638679	2020/12/22	B.1.1.214
TKYT30408_2020	LC593816	2020/8/12	B.1.1.214	TKYT76080_2021	LC623948	2021/1/15	R.1
TKYE630411_2020	LC593817	2020/8/12	B.1.1.214	TKYT76107_2021	LC623949	2021/1/15	R.1
TKYE630414_2020	LC593818	2020/8/12	B.1.1.214	TKYT76137_2021	LC623950	2021/1/15	R.1
TKYT30430_2020	LC593819	2020/8/12	B.1.1.214	TKYT78062_2021	LC606022	2021/1/19	B.1.1.7
TKYE640511_2020	LC623934	2020/9/14	B.1.1.214	TKYT88146_2021	LC632055	2021/3/5	B.1.1.7
TKYT40533_2020	LC623935	2020/9/14	B.1.1.214	TKYT88333_2021	LC632056	2021/3/6	B.1.1.7
TKYE640542_2020	LC623936	2020/9/14	B.1.1.214	TKYT88334_2021	LC632057	2021/3/6	B.1.1.7
TKYE640544_2020	LC623937	2020/9/14	B.1.1.214	TKYT91934_2021	LC636488	2021/3/27	B.1.1.220
TKYE640726_2020	LC623938	2020/9/14	B.1.1.284	TKYTK1734_2021	LC633760	2021/4/10	B.1.617.2
TKYE641630_2020	LC632047	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTS147_2021	LC633762	2021/4/12	B.1.1.7
TKYT41678_2020	LC633752	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTS151_2021	LC633763	2021/4/12	B.1.1.7
TKYE641680_2020	LC606018	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTK5356_2021	LC633761	2021/4/27	B.1.617.1
TKYE641701_2020	LC606019	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTS335_2021	LC638686	2021/5/1	R.1
TKYE641834_2020	LC632048	2020/9/17	B.1.1.284	TKYTS301_2021	LC636492	2021/5/6	B.1.1.7
TKYE641838_2020	LC606020	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTS305_2021	LC636493	2021/5/6	B.1.1.7
TKYT42660_2020	LC632049	2020/9/17	B.1.1	TKYTK8211_2021	LC636489	2021/5/10	B.1.1.7
TKYT42666_2020	LC606021	2020/9/17	B.1.1.214	TKYTK8252_2021	LC636490	2021/5/10	B.1.1.7
TKYT48900_2020	LC633753	2020/10/21	B.1.1.214	TKYTK8985_2021	LC636491	2021/5/10	B.1.1.7
TKYT49876_2020	LC633754	2020/10/27	B.1.1.284	TKYTS339_2021	LC636494	2021/5/12	B.1.1.214
TKYT50424_2020	LC623939	2020/10/29	B.1.1.284	TKYTK10029_2021	LC638681	2021/5/17	B.1.1.7
TKYT50458_2020	LC623940	2020/10/29	B.1.1.214	TKYTK10145_2021	LC638682	2021/5/17	B.1.1.7
TKYT50484_2020	LC623941	2020/10/29	B.1.1.214	TKYTK11408_2021	LC638683	2021/5/24	B.1.1.7
TKYT50512_2020	LC623942	2020/10/29	B.1.1.214	TKYTK11623_2021	LC638684	2021/5/24	B.1.1.7
TKYT50837_2020	LC623943	2020/10/29	B.1.1.214	TKYTK12038_2021	LC638685	2021/5/26	B.1.1.7
TKYE650841_2020	LC623944	2020/10/29	B.1.1	TKYTS371_2021	LC638687	2021/5/28	C.36.3

考えられるL452R変異を有しているが、病原性等の詳しい特性については不明である。

SARS-CoV-2の系統分類を行うことにより、都内で流行している株の系統が明らかになり、その株が現在世界のどの地域で流行しているか明らかになる。その結果、感染の原因の解明やその広がりといった感染経路の特定に有用な情報を得ることができる。また、今回行ったSARS-CoV-2の分離株の系統分類より、新たな流行は感染力の強い系統の流入により起こると考えられた。そのため、特に海外で懸念される系統の流入には注視する必要がある。現在、変異株サーベイランスでモニタリングしているN501YやL452Rなどのスパイク領域の重要な変異は、それぞれ複数の系統で確認されている。そのため、変異株サーベイランスで検出されたスパイク領域の変異を有する株がどの系統に属するか知るためにはNGSによる全長配列の取得が有効である。

3. SARS-CoV-2翻訳領域の発現量解析

第3波に流行した系統（B.1.1.214およびB.1.1.284、以下、従来株）13株および第4波に流行した系統（B.1.1.7、アルファ株）12株の計25株について、SARS-CoV-2参照配列の各タンパク翻訳領域別にマッピングされたリード数からTPM（Transcripts Per Million）を算出した（表3）。その結果、すべての株でN（ヌクレオカプシド）領域のTPMが最も高くなった。また、従来株とアルファ株のタンパク翻訳領域別の発現比について調べた結果、大きな差は見られなかったものの、アルファ株のN領域およびORF8領域において、 $p < 0.01$ ($-\log_{10}(\text{p-values}) > 2.0$) で従来株よりも増加傾向を示した（図2）。

今回行ったSARS-CoV-2の分離培養株のNGS解析では、分離株中のRNAを解析しており、SARS-CoV-2のゲノムRNAおよび各タンパク翻訳領域から転写されるサブゲノミックRNAが含まれる。そこで、SARS-CoV-2のゲノムの翻訳領域にマッピングされたリード数から各領域の発現量について推定した。最も多く発現しているNタンパクは複製されたウイルスゲノムと結合し、ヌクレオカプシド複合体の形成やウイルスゲノムの保護、免疫逃避などの機能を有し、特に感染細胞内に多く発現するタンパク質である²³⁾。アルファ株のNタンパクは従来株より増加傾向という結果から、アルファ株の複製機構の活性化と感染性の増加に関与していると推定される。また、アルファ株にはORF8領域にストップコドンへ変化する変異が存在するが（Q27stop）、この変異によるORF8タンパクの機能変化と発現量の増加がアルファ株の性質に影響している可能性がある。

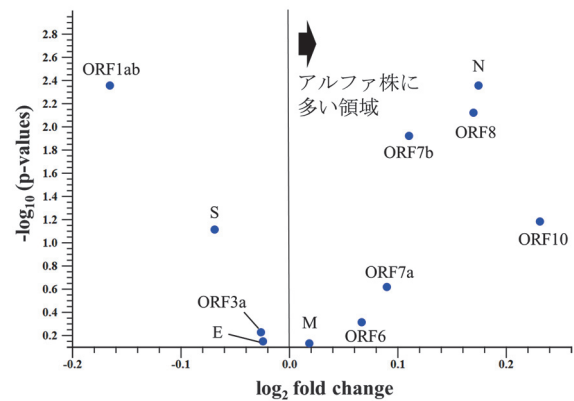


図2. 従来株とアルファ株の翻訳領域別の発現比と統計的有意性

表3. 従来株（B.1.1.214およびB.1.1.284）とアルファ株（B.1.1.7）の翻訳領域別の発現量（TPM：100万リードあたりのリード数）

株名	Pangolin 系統	領域										
		ORF1ab	S	ORF3a	E	M	ORF6	ORF7a	ORF7b	ORF8	N	ORF10
TKYT51733	B.1.1.284	91,372	95,786	85,355	85,459	88,259	75,803	86,585	53,238	111,809	133,645	92,688
TKYT51776	B.1.1.214	107,589	102,845	88,782	110,666	80,271	65,756	79,189	52,751	108,885	132,550	70,714
TKYT51778	B.1.1.284	91,550	98,670	74,910	82,701	82,330	117,382	75,922	45,110	107,104	143,742	80,580
TKYT51806	B.1.1.284	87,032	93,178	83,998	103,958	83,357	68,359	99,367	50,027	109,884	140,647	80,192
TKYT51811	B.1.1.284	77,428	83,906	78,556	97,932	74,492	78,291	86,648	83,352	135,277	129,441	74,678
TKYT51821	B.1.1.284	81,609	84,819	89,194	90,743	100,490	41,275	98,137	52,182	100,259	180,263	81,030
TKYT51924	B.1.1.284	85,501	92,510	83,682	100,143	79,097	76,974	96,748	53,441	104,994	140,069	86,842
TKYT51927	B.1.1.214	89,302	93,830	83,746	107,004	80,521	69,804	89,628	51,066	113,644	147,637	73,817
TKYT61324	B.1.1.214	83,837	82,323	84,788	99,087	102,268	38,927	100,791	45,478	100,040	185,302	77,159
TKYT61988	B.1.1.214	89,167	95,327	75,757	94,524	89,480	74,990	93,409	55,775	111,769	120,495	99,308
TKYT62063	B.1.1.214	104,311	100,677	80,944	114,315	84,628	65,265	99,224	52,938	103,266	130,348	64,084
TKYT62200	B.1.1.284	91,276	98,299	84,437	106,998	80,565	67,445	97,543	46,204	116,374	134,153	76,707
TKYT66767	B.1.1.214	108,947	98,572	78,629	114,219	98,614	65,338	90,127	52,610	109,101	146,745	37,097
TKYTS147	B.1.1.7 (Alpha)	89,223	90,664	81,186	85,597	87,516	90,935	87,686	65,711	130,344	131,828	59,308
TKYTS151	B.1.1.7 (Alpha)	92,822	96,483	74,701	114,326	74,624	92,636	86,912	58,014	105,018	130,203	74,263
TKYTS301	B.1.1.7 (Alpha)	81,004	89,150	77,361	94,300	80,846	83,595	96,958	64,251	111,187	135,507	85,841
TKYTS305	B.1.1.7 (Alpha)	74,910	83,616	73,611	97,079	77,416	76,793	108,140	54,517	110,822	147,109	95,987
TKYTK8211	B.1.1.7 (Alpha)	81,407	89,309	84,625	95,472	80,270	82,637	99,603	58,819	109,036	136,134	82,688
TKYTK8252	B.1.1.7 (Alpha)	73,633	83,400	80,935	100,419	79,566	76,562	109,171	54,465	115,026	143,986	82,837
TKYTK8985	B.1.1.7 (Alpha)	70,895	81,719	77,453	102,146	82,031	74,943	108,521	52,893	117,926	151,143	80,331
TKYTK10029	B.1.1.7 (Alpha)	80,149	89,312	82,894	90,412	85,820	73,064	105,343	49,163	114,104	163,178	66,560
TKYTK10145	B.1.1.7 (Alpha)	81,385	86,560	83,566	96,004	81,907	67,134	105,764	53,420	106,366	147,489	90,404
TKYTK11408	B.1.1.7 (Alpha)	72,496	83,835	80,313	97,560	84,787	63,678	100,721	54,381	120,036	156,417	85,778
TKYTK11623	B.1.1.7 (Alpha)	74,345	85,787	77,195	100,582	83,798	71,841	100,430	57,334	116,039	151,364	81,285
TKYTK12038	B.1.1.7 (Alpha)	82,220	87,509	77,270	95,303	82,102	79,504	91,527	59,444	106,782	152,573	85,766

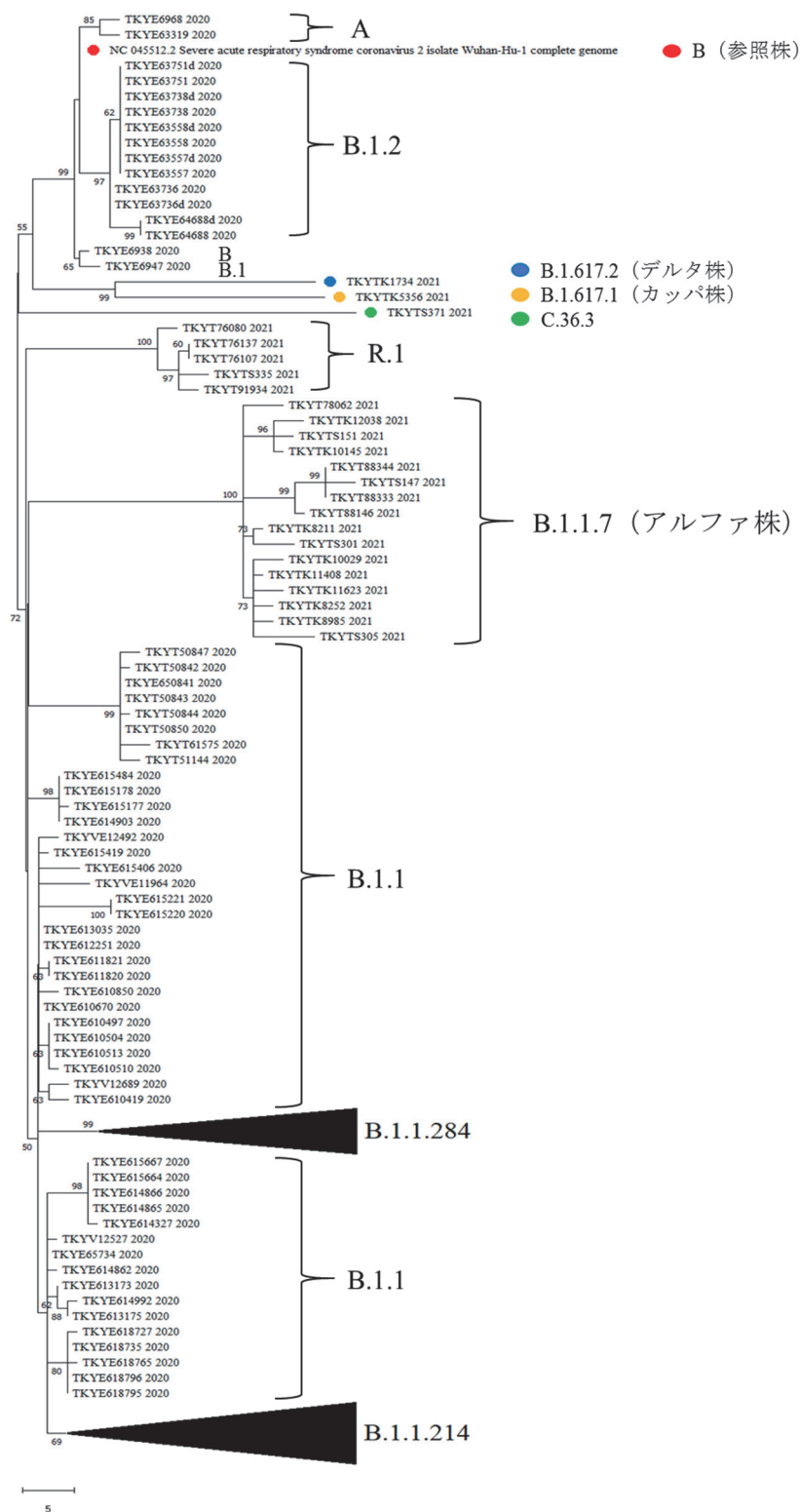


図 3. 東京都内 SARS-CoV-2 分離株の系統樹解析

4. 分子系統樹解析

今回行った分離株110件および前報⁴⁾にて解析を行った49件と1件の参照配列を合わせた計160件の系統樹解析を行った。その結果、2020年3月までに検出されたA系統やB.1.2系統は、武漢で報告された参照株に近い箇所に位置した(図3)。第1波の主体であったB.1.1系統は小さなクラスターが複数形成され、B.1.1系統から第2波や第3波の主体であったB.1.1.214系統とB.1.1.284系統が分岐した。

B.1.617.1系統、B.1.617.2系統、C.36.3系統はB.1.1系統から独立した系統となり、参照株やA系統やB.1.2系統と近い場所に位置した。

系統樹解析より、デルタ株とカッパ株およびC.36.3系統は日本系統株(第1波で日本に侵入したB.1.1, およびB.1.1から派生したB.1.1.214系統とB.1.1.284系統、世界での検出数の中で日本が多いR.1系統を日本系統株とした)と系統樹では離れた箇所である初期の武漢参照株に近い箇所に位置していた。アルファ株はB.1.1からの派生であるが、日本系統株と変異数や変異の箇所が大きく異なるため、系統樹では日本系統株と離れた箇所に位置した。これらの結果より、アルファ株やデルタ株、C.36.3系統株はそれぞれ武漢で報告された株から初期に見られた系統が世界各地へと広がった後、国境を越えた人流の制限によりそれぞれの国内や地域内の流行により変異を繰り返し、感染力が高まったと考えられた。

系統樹解析は分離株間の類縁関係を表しており、SARS-CoV-2の進化の過程を知ることができる。東京都ではSARS-CoV-2が国内に侵入した時期から分離培養を行い、全長の解析を行っている。そのため、これまで蓄積した分離株の全長配列は、系統樹解析などの分子疫学解析に有用であると考えられた。

ま と め

2020年6月1日から2021年5月31日までに東京都内にて新型コロナウイルス感染症が疑われて搬入された検体について、VeroE6細胞またはVeroE6/TMPRSS2細胞により分離培養を行い、NGSを用いてSARS-CoV-2の全長塩基配列を取得し、解析を行った。解析の結果、欧州からの帰国者によって感染拡大した第1波の主流株が国内で変異を積み重ねて第2波や第3波の主流株となった。第4波では海外で流行した変異株が国内に侵入し、流行の主体となった。SARS-CoV-2の分離株のNGS解析は、変異によるウイルスの性質の変化の比較や疫学解析に有用であると考えられた。

文 献

- 1) 東京都: 新型コロナウイルス感染症対策サイト,
<https://stopcovid19.metro.tokyo.lg.jp/> (2021年6月1日現在。なお本URL は変更または抹消の可能性がある)
- 2) GISAID : <https://www.gisaid.org/> (2021年6月1日現在。なお本URL は変更または抹消の可能性がある)

3) Nextstrain :

<https://nextstrain.org/narratives/ncov/sit-rep/ja/2020-03-20>
(2021 年 6 月 1 日現在。なお本URL は変更または抹消の可能性がある)

- 4) 浅倉弘幸, 長島真美, 熊谷遼太, 他: 東京健安研七
年報, **71**, 65-72, 2020.
- 5) 関塚剛史, 糸川健太郎, 谷津弘仁, 他: 病原体検出
情報, **42**, 79-81, 2021.
- 6) Leung, K., Shum, HH, M., Leung, M, G., *et al.*: *Euro
Surveill*, **26**, 2020.
- 7) Public Health England: SARS-CoV-2 variants of concern
and variants under investigation in England: technical
briefing 14, 2021.
- 8) Davis, GS., Abott, S., Barnard, C, R., *et al.* : *Science*, **372**,
6538, 2021.
- 9) Schaecher, R, S., Mackenzie, M, J., Pekosz, A., *et al.* : *J Virol*, **81**,
718-731, 2007.
- 10) Hassan, S, Sk., Choudhury, P, P., Roy, B., *et al.* : *Meta Gene*,
28, 100873, 2021.
- 11) Young B.E., Fong S.-W., Chan Y.-H., *et al.* : *Lancet*, **396**,
603-611, 2020.
- 12) Pereira, F., *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **550**, 8-14,
2020.
- 13) Yang, J., Zhang, G., Yu, D., *et al.* : *bioRxiv*, 2021.
- 14) Verma, R., Saha, S., kumar, S., *et al.* : *bioRxiv*, 2021.
- 15) Islam, R, M., Hoque, N, M., Rahman, S, M., *et al.* : *Scientific
Reports*, **10**, 14004, 2020.
- 16) Lulla, V., Wande, M., Bandyra, K., *et al.* : *bioRxiv*, 2021.
- 17) Abe, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., *et al.* : *medRxiv*, 2021.
- 18) Korber, B., Fischer, M, F., Gnanakaran, S., *et al.* : *Cell*, **182**,
812-827, 2020.
- 19) 関塚剛史, 糸川健太郎, 谷津弘仁, 他: 病原体検出
情報, **42**, 61-64, 2021.
- 20) Nagano, K., Tani-Sassa, C., Iwasaki, Y., *et al.* : *medRxiv*,
2021.
- 21) 東京都福祉保健局: 都内の変異株の発生割合 (東京
都健康安全研究センターによる調査),
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/kansen/screening.html> (2021年7月1日現在。なお本URL は変更または抹消の可能性がある)
- 22) Public Health England: SARS-CoV-2 variants of concern
and variants under investigation in England: technical
briefing 13, 2021.
- 23) Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., *et al.* : *Viruses*, **13**, 1115, 2021.

**Genetic Analysis of SARS-CoV-2 Isolated in Tokyo Using Next Generation Sequencer (NGS)
(June 2020 to May 2021)**

Hiroyuki ASAKURA^a, Isao YOSHIDA^a, Ryota KUMAGAI^a, Kai KOBAYASHI^a, Noeru HASEGAWA^a, Hirofumi MIYAKE^a,
Takushi FUJIWARA^a, Michiya HASEGAWA^a, Masaki HAYASHI^a, Miyuki NAGANO^a, Akane NEGISHI^a,
Takako YAMAZAKI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Yu YAOITA^a, Kenshiro KUROKI^a, Yurie KITAMURA^a, Emiko KAKU^a,
Maya ISOGAI^a, Kohji MORI^a, Sachiko HARADA^a, Ai SUZUKI^a, Fumi KASUYA^a, Arisa AMANO^a, Tomohiro KOSUGI^a,
Yukinao HAYASHI^a, Mami NAGASHIMA^a, Jun SUZUKI^a and Kenji SADAMASU^a

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), initially labeled as 2019-nCoV, continues to be a pandemic agent worldwide. Since its first outbreak in Tokyo on January 2020, its spread has intermittently continued. In this paper, we report the full-length sequences of SARS-CoV-2 isolated by Vero cells in Tokyo from June 2020 to May 2021 that were obtained using next-generation sequencing (NGS) and subsequently analyzed. Therefore, we obtained derived strains unique to Japan from the second wave (July to August 2020) to the third wave (December 2020 to January 2021), which was widespread among returnees from Europe in the first wave (March to May 2020). Beginning the fourth wave, which started in March 2021, it was thought that strains prevalent overseas (VOC: Variant of Concern, VOI: Variant of Interest) invaded Japan one after another and became epidemic strains.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, isolated strain, mutation strains, NGS, phylogenetic tree analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan