

東京都で検出された新型コロナウイルス変異株の分子系統樹解析

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

2021年4～7月に都内で検出された380例の新型コロナウイルスについて、変異株を中心に次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を決定した。また、アルファ株およびデルタ株について、国際ゲノムデータベースに登録された国内各地域で検出された事例の塩基配列情報と系統樹解析を行った。その結果、アルファ株については国内で広がり始めた当初は東京都および近県3県と関西圏で地域ごとにクラスターを形成する傾向がみられていたが、その後、地域差が認められなくなった。一方、デルタ株では感染拡大初期では地域により分かれたクラスターがみられたが、その後の比較ではより短い期間に地域別クラスターの差が小さくなり、短期間に同一起源から感染が拡大した影響を反映している可能性が推察された。

キーワード：新型コロナウイルス，COVID-19，SARS-CoV-2，変異株，GISAID，アルファ株，デルタ株

はじめに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因とされる新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、2019年12月に中華人民共和国の武漢で初めて報告され^{1,2)}、その伝播の過程で様々な変異を生じながら、今現在も全世界に拡散している。

SARS-CoV-2は、約29.9kbの一本鎖プラス鎖RNAウイルスであり、校正機能を有しているが年間24～25塩基/ゲノムの変異を生じていることが報告されている³⁾。また、本ウイルスのゲノムに認められる一塩基多型（single nucleotide polymorphisms；SNPs）は、ウイルスの伝播元の推定や拡散の追跡に用いることができる^{4,5)}。元来、ゲノム中に生じる突然変異の多くはアミノ酸の変化を伴わない中立的なものであるが、進化速度が速いウイルスにおいては、新たな変異や複数変異の組み合わせが選択的優位性を与える例が報告されている^{6,7)}。特に、SARS-CoV-2においては表面構造であるスパイクタンパク質が細胞侵入時にAngiotensin-Converting Enzyme (ACE)2レセプターと結合することが知られており⁸⁾、中和抗体の重要な標的でもあるスパイクタンパク領域に生じた変異は、疫学的な面のみならず感染防御の面においても特に重要な意味を持つ。

SARS-CoV-2について、感染性や伝播性の増強、あるいは既感染者やワクチン接種者が獲得した免疫効果に影響を与える可能性がある変異を有する株（変異株）は、世界保健機構（WHO）において「懸念される変異株（Variants of Concern；VOCs）」や、「注目すべき変異株（Variants of Interest；VOIs）」と定義されてい

る⁹⁾。これらに基づき、世界各国では感染状況を考慮しつつ個別に変異株の定義がなされており^{10,11)}、我が国では国立感染症研究所（感染研）が4種のVOCs（N501Y変異を有するアルファ・ベータ・ガンマ、およびL452R変異を有するデルタ）と1種のVOIs（L452R変異を有するカッパ）を定義している¹²⁾（2021年8月1日現在）。

現在、厚生労働省は国内における変異株の発生や感染拡大の把握を目的に、地方自治体に対してVOCsを中心としたサーベイランスを行うこと求めている¹³⁾。これを受け、東京都健康安全センターでは積極的疫学調査でSARS-CoV-2検査陽性となった検体を中心に、RT-リアルタイムPCR法による変異株の検出を実施している。今回、それらの検体のうちウイルス量が多い検体を対象に、次世代シーケンサー（NGS）を用いた全ゲノム解析を実施した。あわせて、国際的なオープンアクセスゲノムデータベースであるGlobal Initiative on Sharing Avian Influenza Data（GISAID）に登録された国内事例の塩基配列情報と比較し、系統樹解析を行ったのでその概要を報告する。

実験方法

1.解析対象

全ゲノム解析では、2021年4～7月に、東京都内の保健所からCOVID-19に関連した積極的疫学調査として当センターへ搬入された検体の陽性例、および民間検査機関等での検査陽性例のうち、変異株検査を目的に当センターへ搬入された検体を抽出した。次いで、長島ら¹⁴⁾のプロトコルにによるRT-リアルタイムPCRを実施し、Ct値

^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

表1. 新型コロナウイルス全ゲノム解析株の変異と分類 (検体採取日別)

スパイク変異	WHO Clade	Pango Lineage	検体採取日				合計 (n=380)
			2021/4/1-30	2021/5/1-31	2021/6/1-30	2021/7/1-31	
N501Y	Alpha	B.1.1.7	40	39	59	71	209
L452R	Delta	B.1.617.2	12	4	15	85	116
L452R	Delta	AY.4		1	11		12
L452R	Delta	AY.12		1	3		4
L452R	Kappa	B.1.617.1	4				4
L452R		C.36.3		1			1
E484K		R.1	15	11			26
E484K		B.1.1*	1	1			2
その他		B.1.1.214	4	1			5
その他		B.1.1**	1				1

*E484K変異あり

**E484K変異なし

が30未満のウイルス量が多い検体を対象とした。

また、系統樹解析では、2021年1～7月にGISAIDへ登録されていた塩基配列データも使用した。

2. SARS-CoV-2スクリーニング・変異株スクリーニング (RT-リアルタイムPCR法)

積極的疫学調査検体のSARS-CoV-2スクリーニングは、Transcription Mediated Amplification (TMA) 法の原理に基づくアプティマ SARS-CoV-2 (ホロジック) によりパンサーシステム (ホロジック) を使用して実施した。TMA法陽性例および変異株検査を目的とした検体について、長島ら¹⁴⁾のプロトコルに従いQuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) を用いたRT-リアルタイムPCRによる変異株スクリーニングを実施した。変異の確認は、スパイクタンパク領域の452番目、484番目および501番目のアミノ酸をコードする塩基における一塩基置換の有無により行った。

3. NGSによる全ゲノム解析

検体からのRNA抽出はQIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いた。ライブラリ調製はItokawaら¹⁵⁾の手法に従って行った。すなわち、ランダムヘキサマーを用いた逆転写反応後、NIID ver.N2プライマーセットを用いて98°C 15秒、64°C 5分、30サイクルのマルチプレックスPCR反応を行い、iSeq 100 i1 Reagent Cartridge v2 (300 cycles) を用いて次世代シーケンサー機器 iSeq (Illumina) により全ゲノム解析を行った。NGSにより得られたデータをUbuntu (Canonical Ltd.) 上でItokawaらのPythonプログラムを用いてプライマー領域の配列をトリミングした後、CLC genomics work bench (QIAGEN) を用いて参照株 (Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2)) とマッピングを行いコンティグ配列を得た。次いで得られたコンティグ配列をWuhan-Hu-1 (NC_045512.2) を含めてMEGA7¹⁶⁾によりアラインメントし、混合塩基やギャップ等がみられた

場合には、Tabletソフトウェア (The James Hutton Institute) を用いて混合塩基やギャップについてマッピング結果を確認した。さらに、FASTA形式のファイルを用いて、Nextclade上 (<https://clades.nextstrain.org/>) により変異解析を行った。取得した配列を共通データベースであるGISAIDに登録し、各配列に固有の番号であるAccession IDの付与を受けた。このようにして得られた配列データ、およびGISAIDに登録されていた既知の配列データについて、MEGA7を用いた近隣結合法 (Neighbor-Joining, NJ) による系統樹解析を行った。

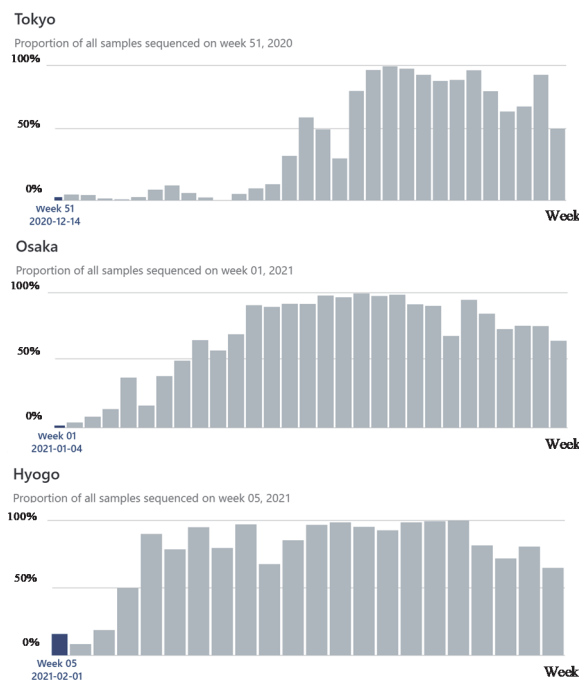


図1. GISAID登録株における各地域のアルファ株の割合 (covSPECTRUMより抜粋し転載)

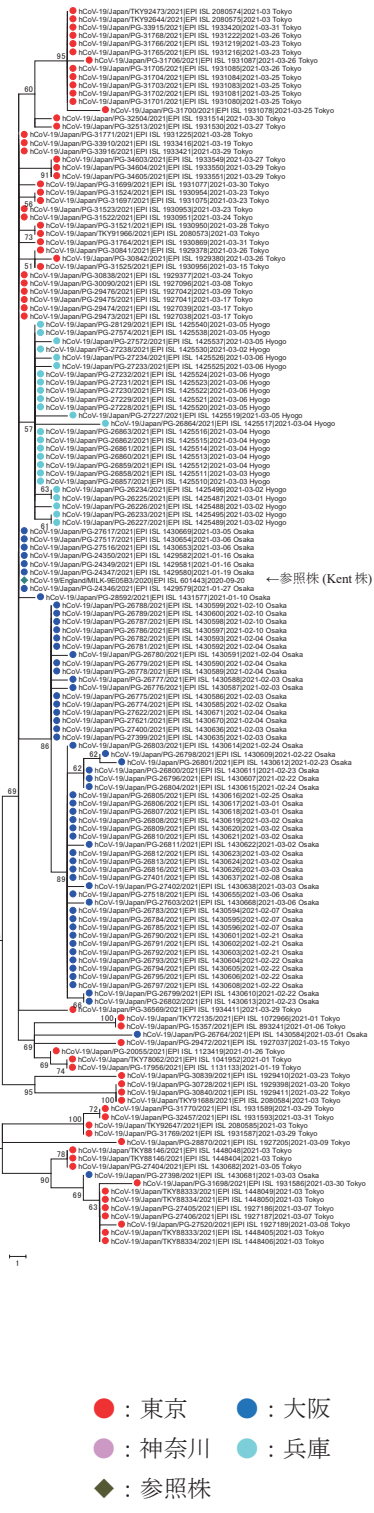


図 2-1: アルファ株 (検体採取日 1/1~3/31)

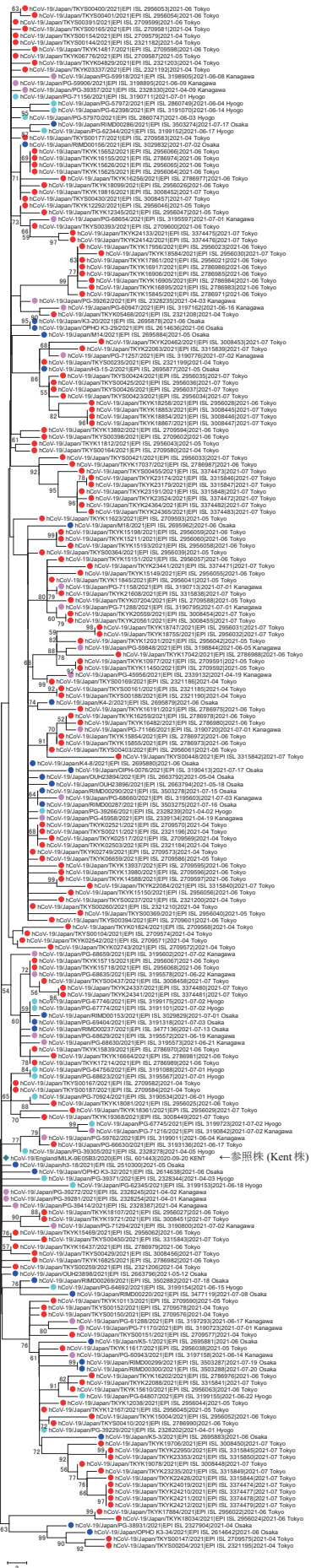


図 2-2: アルファ株 (検体採取日 4/1~7/31)

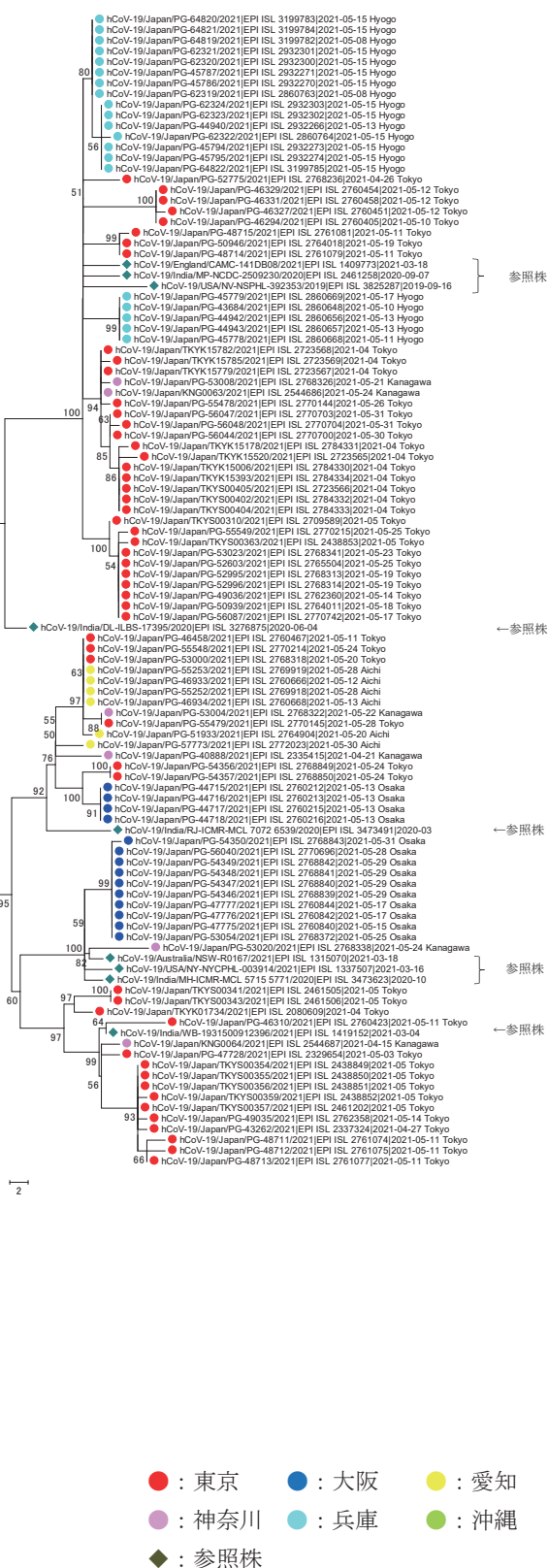


図 3-1: デルタ株 (検体採取日 4/1-5/31)

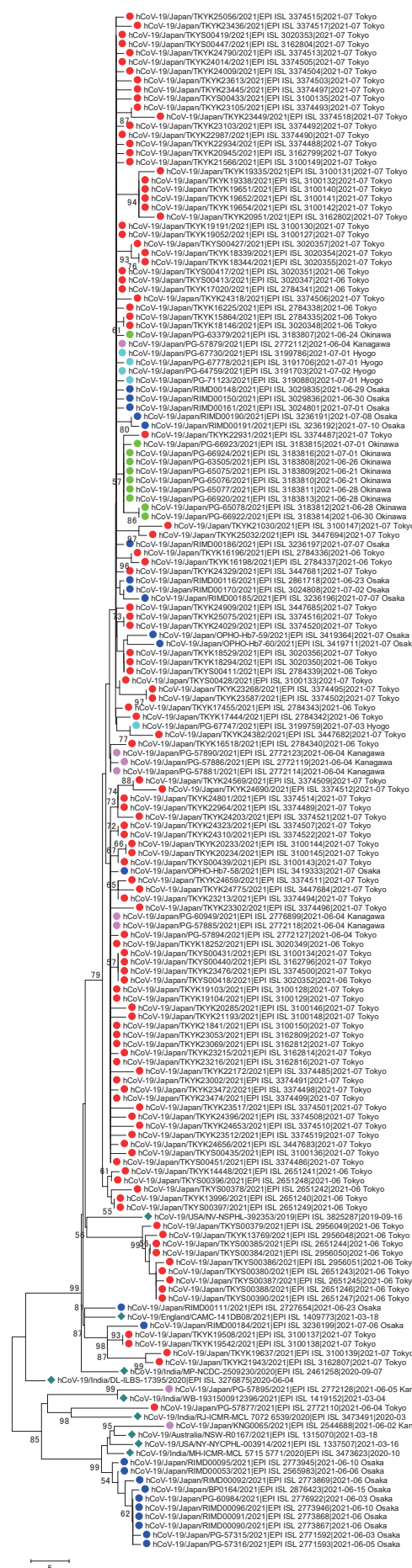


図 3-2: デルタ株 (検体採取日 6/1-7/31)

結果および考察

1. 解析した変異株の種類と検出時期の傾向

Centre for Genomic Pathogen Surveillanceが作成したソフトウェアPangolin (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) により付番された表記による分類を表1に示した。全ゲノム解析が可能であった380例のうち、我が国でVOCsに分類されている変異株はアルファ株が209例、デルタ株が132例 (B.1.617.2: 116例, AY.4: 12例, AY.12: 4例) 検出された。また、VOIsおよびその他の変異株ではカップ株が4例, C.36.3が1例, E484K変異を有するR.1が26例検出され、いわゆる従来株であるB.1.1やB.1.1.214も認められた。

なお、変異株の検出時期について見ると、アルファ株は2021年3月から都内で検出され始め、4月下旬から7月上旬までは陽性検体のうち6割以上を占めた後、減少に転じた。一方、デルタ株は6月から検出割合が増加し、7月末にはアルファ株と逆転して6割以上となった後、都内の流行株はデルタ株にほぼ置き換わった¹⁷⁾。すなわち、東京都内のSARS-CoV-2流行株は、いわゆる国内第四波 (2021年4～6月) ではアルファ株、国内第五波 (2021年6月～) ではデルタ株が中心となり、スパイクタンパクに特徴的な変異を有する異なった株が、短い期間に入れ替わる形で感染が拡大したと考えられた。

GISAID登録データを基にした解析ツール (covSPECTRUM, <https://cov-spectrum.ethz.ch/>) を用いた解析では、アルファ株は東京都では2020年12月14日の検体が最初に登録されているのに対し、大阪府は2021年1月4日、兵庫県では2月1日の登録が最初である (図1)。最初の登録は東京都が先であったが、検出株に占めるアルファ株の割合が50%を超えるまでに要した時間は、東京都よりも大阪府や兵庫県の方が短かった。なお、東京都のアルファ株のNGS解析については、2021年4月18日まで全て確認検査として感染研に送付し行われた。

2. アルファ株の系統樹解析

当センターで全ゲノム解析したアルファ株209配列にGISAID登録データ (2021年1～7月に東京を含む国内各地域でのアルファ株配列、およびイギリスKent地方で検出され2020年9月に登録されたアルファ株; Kent株) を加えて系統樹を作成した。その結果、2021年1～3月の東京都内には、Kent株に近い系統とそれらから派生した系統、およびそれ以外の系統のものが存在していた。また、国内全体においても、東京都と関西圏では異なるクラスターが形成され、地域により分散したクラスターの形成がみられた (図2-1)。一方、4～7月になるといざいれも特徴的なクラスターの形成がみられず、小さなクラスターが数多く存在するものの、地域的な特異性はみられなくなっていた (図2-2)。これらの結果から、アルファ株の都内流行初期はKent株とほぼ同じ配列のウイ

ルスが東京や大阪でみられ、その後、感染拡大に伴って各地域でそれぞれ独自に変異を蓄積していった可能性が示唆された。

3. デルタ株の系統樹解析

2021年4～7月のデルタ株132例の配列に加え、対応する期間に国内各地域で検出されたGISAID登録株、および参照株としてインド・イギリス・アメリカ・オーストラリアの各国で2021年3月以前に検出されたデルタ株の配列を用いて系統樹を作成した。4、5月に検出された株の傾向として、東京においては少なくとも3つのクラスターに分かれ、国内全体でも、東京・大阪・兵庫などで特徴的なクラスターが形成されていた (図3-1)。これは異なる起源由来のものから伝播・派生したものと推定される。一方、6、7月では大阪府の一部や沖縄県の例でクラスターの形成がみられるものの、地域に特徴的なクラスターがみられなくなっていた (図3-2)。このことは同一の系統から派生した一部のクラスターが急激に拡大した影響を反映している可能性を示すものと考えられる。

感染研が行った国内で流行するデルタ株の分子疫学的調査では¹⁸⁾、国内症例の始まりとしてはそれぞれ独立した異なる系譜を示す海外からの流入が考えられ、少なくとも7つの起点の存在を推定している。うち関西や南関東などの6つの起点は顕著な拡大がみられず終息したと推定しているのに対し、5月18日を初検出とするそのうちの一つの起点が首都圏で拡大した後全国へ波及し、現在も全国規模に拡大を続けているとしている。

COVID-19の発生により感染症への対応は大きく変化し、ゲノム情報が感染の拡大防止対策においても積極的に応用されるようになった。今年に入り、全国の地方衛生研究所等で検出されたSARS-CoV-2に対しては精力的なゲノム解析が実施され、その結果としてリアルタイムに全国規模でゲノムデータの解析を行うことが可能となった。その一方で、有用な疫学的知見を得るための解析には、検査・研究機関の間での迅速なデータ共有化が必須となる。そのためには、解析したデータをGISAIDのような国際的なデータベースへ遅滞なく登録して行くことが、危機管理時には重要な要素になると思われる。

まとめ

N501Y変異を有するアルファ株は、国内に広がり始めた当初は東京都および近県3県と関西圏で地域により分かれたクラスターの形成がみられていたが、4月以降は地域の差がみられなくなった。

L452R変異を有するデルタ株においても、感染拡大初期である4、5月では地域によって特徴的なクラス

一がみられた。一方、6、7月の例の比較では大阪府の一部や沖縄県の例でクラスターの形成がみられるものの全体では地域間の差が小さく、短期間に同一起源から感染が拡大した影響を反映している可能性が推察された。NGSによる新型コロナウイルスの全ゲノム解析は、各事例相互の関連性を明らかとし伝播の状況に関する有用な疫学的知見を提供するものと考えられる。

文 献

- 1) Wang, D., Bo H., Hu, C., *et al.*: *JAMA*, **323**, 1061-1069, 2020.
- 2) Ren, L., Wang, Y., Wu, Z., *et al.*: *Chin. Med. J. (Engl)*, **13**, 1015-1024, 2020.
- 3) Nextstrain, <https://nextstrain.org/ncov/global?l=clock> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 4) Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., *et al.*: *Nat. Microbiol.*, **5**, 1403-1407, 2020.
- 5) Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., *et al.*: *Bioinformatics*, **34**, 4121-4123, 2018.
- 6) European Centre for Disease Prevention and Control. Threat assessment Brief: Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom. December 20, 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/SARS-CoV-2-variant-multiple-spike-protein-mutations-United-Kingdom.pdf>. (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 7) Tchesnokova, V., Kulakesara, H., Larson, L., *et al.*: *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432189>, 2021.
- 8) Ying-Ying Zheng, Y., Ma, Y., Zhang, J., *et al.*: *Nature Reviews Cardiology*, **17**, 259-260, 2020.
- 9) WHO: Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 10) CDC: SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 11) GOV.UK: Research and analysis Variants: distribution of case data, 16 July 2021. <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-case-data-16-july-2021> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 12) 国立感染症：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）の新規変異株について（第11報）。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2484-idsc/10530-covid19-50.html> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 13) 新型コロナウイルス感染症の積極的疫学調査における検体提出等について、厚生労働省健康局課長通知、健感発0205第4号、令和3年2月5日
- 14) 長島真美，熊谷遼太，河上麻美代，他：東京健安研セ年報，**72**，65-71，2021.
- 15) Itokawa, K., Sekizuka, T., Hashino, M., *et al.*: nCoV-2019 sequencing protocol for illumine V. 3, 2020. https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-for-illumina-bnn7mdhn?version_warning=no (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 16) Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K.: *Mol Biol Evol.*, **33**, 1870-1874, 2016.
- 17) 健安研におけるゲノム解析等による都内の変異株の発生状況（モニタリング会議資料抜粋）
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/kansen/corona_portal/henikabu/screening.files/screening_090202.p (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 18) 国立感染症：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）の新規変異株について（第12報）。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2484-idsc/10554-covid19-52.html> (2021年7月20日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性ある)

Phylogenetic Analysis of SARS-CoV-2 Variants Detected in Tokyo

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

The whole genome sequences of 380 severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) variants detected in Tokyo from April to July 2021 were determined by next-generation sequencing. Their alpha and delta strains, compared with the nucleotide sequences of the registered domestic regional cases to international genome database, were analyzed with a phylogenetic tree. Therefore, in the case of alpha strains, there was a tendency for cluster formation in each region in Tokyo and the three neighboring prefectures and the Kansai region when it began to spread in Japan. Though in the subsequent period, slight regional differences were seen. Also, in the delta strains, clusters divided by region were seen in the early stage of spread, but in the later stage, the difference between the clusters by region became smaller in a shorter period. It was inferred that it may be a reflection of the effect of the spread of infection from the same origin in a short period.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, variant, global initiative on sharing avian influenza data (GISAID), alpha strain, delta strain

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