

新型コロナウイルス感染症の持続感染事例におけるSARS-CoV-2遺伝子解析

黒木 絢士郎^a, 横田 翔太^a, 磯貝 まや^a, 根岸 あかね^a, 天野 有紗^a, 浅倉 弘幸^a, 永野 美由紀^b,
原田 幸子^a, 熊谷 遼太^a, 鈴木 愛^c, 河上 麻美代^a, 糟谷 文^a, 北村 有里恵^a, 伊藤 仁^a,
矢尾板 優^a, 長谷川 道哉^a, 藤原 卓士^a, 三宅 啓文^d, 長島 真美^a, 貞升 健志^d

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が2019年末に中国で初めて検出された後, アルファ株, デルタ株やオミクロン株などの変異株が出現するごとに流行の波が起り, 現在も完全なる収束には至っていない. 特にオミクロン株から派生した亜系統は, 免疫逃避能が高いアミノ酸変異を多数獲得しながら急速かつ同時に出現し, 感染者数の増加やワクチンの開発などに影響を与えてきた. また, 免疫不全患者の体内での持続感染は新たな変異株の発生につながりやすいことが報告されている. 本報告では, 都内において長期にわたってSARS-CoV-2に感染した2症例について, 臨床検体中のSARS-CoV-2を次世代シーケンサー (NGS) による全ゲノムの比較解析を行い, 持続感染によって生じた変異について調査した. その結果, SARS-CoV-2の遺伝子変異は通常1か月に1~2塩基程度起こるとされているが, 持続感染者の体内ではそれよりも速いスピードで変異が生じていた. また, 持続感染により生じたアミノ酸変異には, オミクロン株の亜系統に見られる特徴的な変異が含まれていた. このことから, 免疫機能の低下した人の体内でSARS-CoV-2の持続感染が起こると, 通常よりも速いスピードで免疫逃避能の高いアミノ酸変異を獲得しやすいことが示唆された.

キーワード: SARS-CoV-2, COVID-19, 持続感染, 次世代シーケンサー, 変異

はじめに

2019年12月に中国で新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が検出されると^{1,2)}, 瞬く間に世界各地に広がり, 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックを起した. 国内でもCOVID-19の流行の波は, 変異株が出現するごとに発生した. 2021年初頭には, N501Y変異をもつアルファ株が流行し, 同年夏頃になるとL452R変異をもつデルタ株に置き換わった. そして同年12月には, スパイクタンパク質に30箇所程度の変異と数か所の欠失・挿入が入り, 従来株よりも変異数をはるかに多いオミクロン株が流行の中心となった³⁾. それ以降, オミクロン株のBA.2系統やBA.5系統から派生する多数の亜系統が急速かつ同時に出現した. 2023年7月現在でもオミクロン株の亜系統が主流の株として流行しており, 感染防御免疫やワクチン接種による中和抗体から逃避するアミノ酸変異を獲得した亜系統株の動向が注視されている⁴⁾.

免疫逃避性のあるアミノ酸変異をもつ変異株の出現は, 免疫不全患者での長期的な感染が1つの要因として指摘されている⁵⁾. 体内に侵入したSARS-CoV-2は, 通常は免疫防御により数日~2週間程度で排除される⁶⁾. しかし, 免疫不全患者や免疫抑制剤による治療を受けている人の体内では, SARS-CoV-2を排除できずにウイルスが残存し, 数か月に渡って持続感染が引き起こされることがある. この

ような免疫機能が低下した人の体内での持続感染事例では, アミノ酸変異が蓄積しやすくなり, 新たな変異株の発生につながり得ると考えられている⁷⁾.

SARS-CoV-2のゲノムサイズは約29,900塩基とRNAウイルスの中で最も大きい. 遺伝子変異は通常1か月に1~2塩基程度生じると推定されている^{8,9)}. SARS-CoV-2はRNA複製時のエラーを校正する機能を有しており, 他のRNAウイルスよりも遺伝子変異が生じにくいとされている¹⁰⁾. コロナウイルスの遺伝子は, 5'末端からおよそ3分の2がORF (オープンリーディングフレーム) 1a/b領域で, ORF1b領域後のおよそ3分の1が主にS (スパイク), M (メンブレン), E (エンベロープ), N (ヌクレオカプシド) をコードする領域で構成されている¹¹⁾. 特にS領域のアミノ酸変異は抗体結合部位の構造に影響を与え, 既存免疫からの逃避能を上昇させることがある¹²⁾.

持続感染により生じたSARS-CoV-2の遺伝子変異について調べるには, 全遺伝子配列を取得して解析する必要がある. 今回, SARS-CoV-2による持続感染事例として疑われる2人の患者について, NGS (次世代シーケンサー) により全ゲノム配列を取得し, 変異解析を行ったのでその概要を報告する.

^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精度管理室

^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

実験方法

1. 供試材料

東京都内の保健所から搬入された検体のうち、1回目の陽性判定から1か月以上後に再び搬入され、SARS-CoV-2陽性が確定した2名のCOVID-19患者（以下、患者A, B）の臨床検体から抽出したRNAを試料として用いた。

患者Aは72歳の男性で、検体は1回目の2022年9月1日と、2回目の2022年10月3日にそれぞれ採取されたもの（以下、検体A1, A2）、患者Bは73歳の女性で、検体は1回目の2022年8月15日と、2回目の2022年11月4日にそれぞれ採取されたもの（以下、検体B1, B2）であった。

2. NGSによる全ゲノム解析

NGSのライブラリー調製は、新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル（QIAGEN社QiaSEQ FX編）手法に従った¹³⁾。核酸抽出物からMultiplex-PCRで98領域（各約400bp）を対象に増幅させた。増幅産物をAmpure XP（ベックマン・コールター）を用いて精製し、QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN）を用いてライブラリーを作成した。次世代シーケンサーの装置としてiSeq 100（Illumina社）を使用し、4検体のSARS-CoV-2全長配列のFastqデータを取得した。FastqデータはUbuntu（Canonical Ltd.）上でItokawaらのPythonプログラムにより、各リード末端のプライマー領域の配列をトリミングし、CLC genomics work bench（QIAGEN）を用いて、武漢株（NC_045512.2）をリファレンス配列としてマッピング処理を行った。マッピング後のリードの確認には Tablet ソフトウェア（The James Hutton Institute）を用いた。得られたFASTA形式のデータについて、Nextclade（<https://clades.nextstrain.org/>）上で変異解析を行った。

結果

1. 取得した全長配列の解析

武漢株に対する遺伝子変異数は、検体 A1（GISAID Accession ID:EPI_ISL_15494863）、A2（GISAID Accession ID: EPI_ISL_15494864）がそれぞれ 70, 76 であり、検体 B1（GISAID Accession ID: EPI_ISL_16026771）、B2（GISAID Accession ID: EPI_ISL_16026772）がそれぞれ 71, 76 であった（図 1）。また、遺伝子欠失数は、検体 A1, A2 とともに 33 であり、検体 B1, B2 がそれぞれ 33, 36 であった。遺伝子挿入は 4 つの検体すべてで存在しなかった。検体 A2 は、A1 と共通する遺伝子変異・欠失に加えて、7 つの遺伝子変異（復帰変異含む）が生じていた。そして検体 B2 は、B1 と共通する遺伝子変異・欠失に加えて、5 つの遺伝子変異と 3 つの遺伝子欠失が生じていた。

患者 A, B の両者とも、2 回目採取検体の遺伝子には、1 回目採取検体の遺伝子変異に加えてさらに欠損を含む遺伝子変異が入っていたことから、再感染事例ではなく、SARS-CoV-2 による持続感染事例であることが考えられた。

2. 患者Aの2つの検体に生じた変異の解析

患者 A の体内での持続感染が疑われる変異の解析では、アミノ酸変異を伴う 6 つの非同義置換と、アミノ酸変異を伴わない 1 つの同義置換 G11179A が生じ（表 1）、Pangolin Lineage は、5.2 から 5.2.6 に変化していた。

ORF1a 領域の Nsp3 をコードする部位にあたる 1543 番目のアミノ酸が T から I に、ORF1b 領域の Nsp12 をコードする部位にあたる 662 番目のアミノ酸が G から S にそれぞれ変異していた。T1543I は XBB.1.5 系統などで、G662S は XBB 系統や BN.1 系統などで見られる変異であった¹⁴⁾。また、国内で認可されている抗ウイルス薬に起因する ORF 領域のアミノ酸変異¹⁵⁾は存在しなかった。S 領域では、346 番目のアミノ酸が R から T に変異していた。この R346T は国際的に懸念される免疫逃避効果をもち、XBB



図 1. 検体 A1,A2 および検体 B1, B2 の全遺伝子領域におけるアミノ酸変異

系統や BQ.1.1 系統などに特徴的に見られる変異であった¹⁶⁾。また、R346T は抗体治療薬 Cilgavimab への感受性の低下に関与することが報告されている¹⁵⁾。

N 領域では、326 番目のアミノ酸が P から L に復帰変異を起こしており、その近くに位置する 327 番目では S から L に変異していた。

検体 A1, A2 の 2 つの結果を比較すると、患者 A の体内で約 1 か月 (32 日間) の持続感染により、1 か月あたり 6.56 塩基の遺伝子変異が生じていた。

表1. 患者Aの体内での持続感染により追加された変異

遺伝子領域	遺伝子変異	アミノ酸変異
ORF1a	C4893T	T1543I
	G11179A	なし
orf1b	G15451A	G662S
S	G22599C	R346T
ORF7a	A277721T	I110L
N	T29250C (復帰変異)	P326L (復帰変異)
	C29253T	S327L

3. 患者Bの2つの検体に生じた変異の解析

患者 B の体内での持続感染が疑われる変異の解析では、7 つの非同義置換 (欠失含む) と、1 つの同義置換 C3787T が生じていた (表 2) . Pangolin Lineage は、5.2 から 5.2.36 に変化していた。

ORF1a 領域の Nsp8 をコードする部位の 4097 番目のアミノ酸が E から K に変異していた。また、国内で認可されている抗ウイルス薬に起因する ORF 領域のアミノ酸変異¹⁵⁾は存在しなかった。

S 領域では 144 番目の Y がアミノ酸を欠失、444 番目の K が T にアミノ酸変異していた。Y144 欠失は BS.1 系統や BA.1 系統などに、K444T は BQ.1 系統などに特徴的に見られ、いずれも国際的に懸念される免疫逃避効果をもつ¹⁷⁾。また、K444T は抗体治療薬 Imdevimab および Cilgavimab への感受性の低下に関与することが報告されている¹⁵⁾。

検体 B1, B2 の 2 つの結果を比較すると、患者 B の体内での約 3 か月 (81 日間) の持続感染により、1 か月あたり 2.96 塩基の遺伝子変異 (欠失含む) が生じていた。

表2. 患者Bの体内での持続感染により追加された変異

遺伝子領域	遺伝子変異	アミノ酸変異
ORF1a	C3787T	なし
	G12554A	E4097K
	21992-21994del	Y144del
S	A22320G	D253G
	A22893C	K444T
ORF7a	C27707T	A105V

考 察

SARS-CoV-2 は通常 1 か月に 1~2 塩基程度変異するといわれているが、2 例の患者における変異のスピードはそれよりも速かった。特に患者 A では、3 倍以上のスピードで遺伝子変異が生じていた。免疫不全患者の体内で持続感染が生じると、通常よりも蓄積する遺伝子変異数が多くなり、SARS-CoV-2 の進化を加速させることが言われている^{7,18)}。本事例でも、SARS-CoV-2 が長期にわたって体内で感染し続けたことが、遺伝子変異を蓄積するスピードの速さにつながったことが両患者の変異の解析結果から考えられた。

2 例の患者の持続感染により S 領域に生じていた R346T あるいは K444T のアミノ酸変異は、ACE2 受容体との親和性の増加や中和抗体からの高い逃避能が知られており、オミクロン株の流行をさらに拡大させたことが報告されている¹⁹⁾。また、オミクロン株の亜系統は、S 領域の R346, K444, V445, G446, N450, L452, N460, F486, F490, R493 の部位に収束してアミノ酸変異が生じている傾向があり、SARS-CoV-2 の収斂進化が起きているとの指摘がされている²⁰⁾。本事例の 2 名の患者においても、約 29,900 塩基の長さの中で生じた数か所のアミノ酸変異は、これらの収斂部位に相当していた。このことから、免疫機能の低下した人で起こる持続感染では、突然変異がランダムに生じるのではなく、収斂部位へある程度の方向性をもって起こる傾向があり、免疫不全患者は新たな変異株の発生源と関連するという考え²¹⁾を支持する結果となった。

ORF 領域で生じたアミノ酸変異部位は、ORF1a 領域の Nsp3 および Nsp8、そして ORF1b 領域の Nsp12 をコードする部位に相当した。特に Nsp8 と Nsp12 は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) を複合体として構成する役割をもつ²²⁾。抗ウイルス薬の 1 つである レムデシビル は RdRp を主な標的部位としており、Nsp12 領域に特定の変異が生じると抗ウイルス効果が減弱されることが報告されている^{23,24)}。また、ORF1a 領域のメインプロテアーゼをコードする部分の変異が、病原性の低下に寄与すると報告されている²⁵⁾が、

A2, B2ではそれらの変異は認められなかった。SARS-CoV-2の感染性や病原性の変化について、S領域で生じたアミノ酸変異を中心に注目されているが、その他の遺伝子領域で生じた変異にも解析することも必要である²⁶⁾。

NGSによる全長配列の取得は、SARS-CoV-2のゲノム変異情報を網羅的に解析していく上で有用であり、今回の持続感染事例のような特異的な事例の解析手段に適していると考えられた。

ま と め

長期に渡って持続感染を起こした2例のCOVID-19患者の臨床検体を用いて、NGSによるSARS-CoV-2の全ゲノム解析を行った。解析の結果、持続感染によるSARS-CoV-2の遺伝子変異速度は通常よりも速かった。また、オミクロン株の亜系統が特徴的に有している免疫逃避能の高いアミノ酸変異がS領域で生じていた。このことから、免疫機能の低下した人でSARS-CoV-2の持続感染が起こると、通常の感染例よりも遺伝子変異が起こりやすく、免疫逃避能をもつアミノ酸変異を獲得しやすいことが示唆された。

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)*, **133**, 1015-1024, 2020.
- 3) SARS-CoV-2(hCoV-19) Mutation Reports Location Tracker : <https://outbreak.info/location-reports> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 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. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/12000-sars-cov-2-27.html> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) Corney, L., Beyrer, C., Cohen, M. *et al*: *Engl J Med*, **385**, 562-566, 2021.
- 6) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2 B.1.1.529系統 (オミクロン株) 感染による新型コロナウイルス感染症の積極的疫学調査 (第1報)：感染性持続期間の検討, 2021. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2484-idsc/10880-covid19-66.html> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) Choi, B., Choudhary, M., Regan, J., *et al*: *Engl J Med*, **383**, 2291-2293, 2020.
- 8) Nextstrain: Genomic epidemiology of novel coronavirus - Global subsampling, <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?l=clock> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) 増田 道明：モダンメディア, **66**, 313-320, 2020.
- 10) Callaway, E.: *Nature*, **585**, 174-177, 2020.
- 11) 神谷 亘：ウイルス, **70**, 29-36, 2020.
- 12) Meng B., Abdullahi A., Ferreira I.: *nature*, **603**, 704-714, 2022.
- 13) 国立感染症研究所：新型コロナウイルスゲノム解析プロトコル Qiagen社QiaSEQ FX編 -version 1.4-,2022. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html> (2023年7月14日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 14) covSPECTRUM, <https://cov-spectrum.ethz.ch/> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 15) Stanford University CORONAVIRUS ANTIVIRAL & RESISTANCE DATABASE, <https://covdb.stanford.edu/sierra/sars2/by-patterns/> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 16) WHO: Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 17) 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23報), 2022. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11680-sars-cov-2-23.html> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 18) Kumata, R., Sasaki, A., *Proceedings of the Royal Society B*, 2022.
- 19) Ito, J., Suzuki, R., Uriu K., *et al* : *Nat Commun*, 2023. doi: 10.1038/s41467-023-38188-z (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 20) Cao, Y., Jian, F., Wang J., *et al*: *Nature*, **614**, 521-529, 2023.
- 21) Sonnleitner, S.T., Prelog, M., Sonnleithner, S., *et al* : *Nat Commun*, 2021. doi: 10.1038/s41467-022-30163-4 (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 22) 白戸 憲也：ウイルス, **70**, 155-166, 2020
- 23) Gandhi, S., Klein, J., Robertson, A., *et al* : *Nat Commun*, **13**, 1547, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-29104-y (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 24) Focosi, D., Maggi, F., McConnell, S. *et al*: *Antivir Res*, **198**, 105247, 2022.
- 25) Abe, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., *et al*.: *medRxiv*, 2021. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.24.20235952v2.full> (2023年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 26) 浅倉弘幸, 吉田勲, 藤原卓士, 他：東京健安研セ年報, **73**, 51-57, 2022.

Genetic analysis of COVID-19 patients with persistent SARS-CoV-2 infection.

Kenshiro KUROKI^a, Shota YOKOTA^a, Maya ISOGAI^a, Akane NEGISHI^a, Arisa AMANO^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Miyuki NAGANO^a, Sachiko HARADA^a, Ryota KUMAGAI^a, Ai SUZUKI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Fumi KASUYA^a, Yurie KITAMURA^a, Hitoshi ITO^a, Yu YAOITA^a, Michiya HASEGAWA^a, Takushi FUJIWARA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

Since the novel coronavirus disease (COVID-19) pandemic began in various parts of the world in 2020, epidemic waves have intermittently occurred with the emergence of a series of variants, such as Alpha, Delta, and Omicron. However, the end of the epidemic has yet to be seen. In particular, substrains derived from the Omicron possess amino acid mutations that have the ability to evade protective immunity and neutralizing antibodies from vaccination. Studies have pointed out that the emergence of such variants were likely to occur due to persistent infections in immunocompromised patients. In this study, clinical samples from two COVID-19 patients with long-term persistent SARS-CoV-2 infection were used for whole-genome analysis via NGS to investigate mutations caused by persistent infections. Our results showed that the frequency of SARS-CoV-2 gene mutations can be estimated to be around 2 bases per month, but mutations occurred at a faster rate with persistent infection. In addition, the amino acids acquired by persistent infections were mutations with high escape ability that most Omicron substrains possess. For this reason, persistent infections with the Omicron variant of SARS-CoV-2 in immunocompromised persons can easily create amino acid mutations with high immune escape ability, thereby generating new variants.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, persistent infection, NGS, mutation

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