

東京都における新型コロナウイルスの全ゲノム解析 (2022年6月～2023年5月)

根岸 あかね^a, 三宅 啓文^c, 原田 幸子^a, 熊谷 遼太^a, 糟谷 文^a, 鈴木 愛^b, 伊藤 仁^a, 天野 有紗^a, 岡田 若葉^a, 黒木 絢士郎^a, 横田 翔太^a, 磯貝 まや^a, 北村 有里恵^a, 林 志直^a, 九澤 香織^a, 浅倉 弘幸^a, 河上 麻美代^a, 矢尾板 優^a, 小泉 美優^a, 藤原 卓士^a, 長谷川 道弥^a, 長島 真美^a, 貞升 健志^c

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は2019年12月に中国で初めて確認され, これまでに数多くの新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 変異株が世界中で報告された。2022年1月から始まった第6波以降は, オミクロン株派生系統のBA.1からBA.5, XBBまでの系統であり, 各系統はさらに多くの亜系統に細分化している。東京都では変異株サーベイランスを目的に, SARS-CoV-2の全ゲノム解析を実施してきた。今回, 2022年6月1日から2023年5月31日の間にNGS解析を実施した113,505件を解析した結果, 2022年6月まではBA.2系統が主流であり, 2022年7月から2023年2月まではBA.5系統のBA.5.2.1系統, 2023年3月以降はXBB系統のXBB.1.5系統が主流となっていた。都内で検出されたXBB系統の系統樹解析では, XBB.1.5系統, XBB.1.9系統, XBB.1.16系統のクレードと, XBB.2.3系統のクレードに大きく分かれ, それぞれ海外株を含むクラスターを形成した。これらの結果より, 全ゲノム解析から亜系統の分類を集計することがCOVID-19の流行状況の詳細な把握に有用と考えられた。

キーワード: COVID-19, SARS-CoV-2, 次世代シーケンサー (NGS), 亜系統, 系統樹解析

はじめに

2019年12月, 中国で初めて確認された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, 瞬く間に世界中に広がったり。2020年1月に国内で最初の患者が確認されて以降, 2023年5月までに8回の感染の波を繰り返し流行が継続している。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は, これまで数多くの変異株が世界中で報告されてきた²⁾。我が国においては, 2021年4月頃の第4波では国内でアルファ株が流行し, 同年8月頃の第5波ではデルタ株が流行した³⁾。さらに, 2022年1月から始まった第6波以降はオミクロン株が流行している。

オミクロン株はBA.1からBA.5までの系統とBA.2系統内の組み換えにより生じたXBB系統に大きく分類され⁴⁾, さらに各系統は多くの亜系統や子孫系統に細かく分類されている。また, 世界保健機構 (WHO) は, SARS-CoV-2の病原性や感染性等の観点から危険性についての分類を行っており, 2023年7月7日時点で注目すべき変異株 (VOI) として, XBB.1.5系統とXBB.1.16系統を指定している⁵⁾。さらに, 監視下の変異株 (VUM) として, BA.2.75, CH.1.1 (BA.2.75.3 系統), XBB, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2, XBB.2.3の7系統を指定している⁵⁾。

VUMに含まれるCH.1.1, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2は孫系統まで指定されているが, 孫系統まで細かく分類し監視するためには次世代シーケンサー (NGS) による全ゲノム解析が必要である。また, 全ゲノム解析は変異株の監視だけでなく, 得られた遺伝子情報を国際的なデータベースであ

るGlobal Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) に登録することにより世界中で遺伝子情報が共有され, 遺伝子検査法の設計⁶⁾や系統樹解析³⁾等でも国際的に活用されている。

東京都では, 都内でSARS-CoV-2が陽性となった検体のNGSによる全ゲノム解析を, 健康安全研究センターおよび民間検査機関 (委託) において実施している。今回は2022年6月から2023年5月に行った全ゲノム解析の結果の集計と系統樹解析を行い, 都内のSARS-CoV-2変異株による流行状況を詳細に把握することを目的とした。

実験方法

1. 材料

2022年6月1日から2023年5月31日の間に, 当センターに搬入されCOVID-19陽性と判断された検体のうち, Ct値が30未満の検体から抽出したRNA 834件をNGS解析の試料とした。また民間検査機関において, 同期間に委託によりNGS解析を実施し, 当センターにデータ (fastaファイルまたはfastqファイル) として送られた112,671件と合わせて, 113,505件を集計の対象とした (2023年7月7日現在)。

2. NGS解析

試料の核酸抽出物からNGSのライブラリーを作製し, 全ゲノム配列を決定した。ライブラリー調製はItokawaらの手法⁷⁾に従って行った。すなわち, 試料中のSARS-CoV-

^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食品微生物研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

2の全長RNAを98領域⁸⁾(各約400 bp長)のマルチプレックスPCR産物として増幅したものを、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製した。次世代シーケンサー装置としてMiSeq[®]システム (Illumina) またはiSeq[™] 100システム (Illumina)を使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータはUbuntu (Canonical Ltd.)上でPythonプログラム⁸⁾を使用して各リード末端に存在するプライマー配列部分を除去し、CLC Genomics Workbench (CLC bio)を用いて参照株へのマッピングによりコンティグを作成し、バリエーション検出を行った。参照株には Wuhan-Hu-1 (NCBI reference sequence: NC_045512.2)を用いた。得られた配列のうち、XBB系統の5系統 (XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.9, XBB.1.16, XBB.2.3)を使用し、MEGA-Xを用いた近隣結合法 (Neighbor-Joining, NJ)⁹⁾による系統樹解析を行った。

3. データ解析

FASTA形式によるファイルを用いて、Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>)で変異解析と配列のクオリティを確認した。クオリティの低いデータを除外したのち、配列をGISAID (<https://www.gisaid.org/>)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。登録後、GISAIDのサーチ機能を使用し各亜系統の集計を行った。

結果と考察

1. 各変異株の月ごとの検出数

全113,505件のGISAIDの亜系統分類による集計結果を表に示す(表1)。各月の検出数は最も少ないのが2023年5月の733件、最も多いのが2022年7月の29,009件であり、月により検出数にばらつきが見られた。検出数が多い月(2022年7月, 12月)は、それぞれ第7波と第8波の患者数が多い月と重なることから¹⁰⁾、検出数の増加は患者数の増加によるものである。また、東京都のGISAID登録数は、国内のGISAID登録総数の約4割を占めていた。

検出された変異株を大きく6系統 [BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, XBB, recombinant (XBBを除く)]に分類し、月ごとに集計した(図1)。BA.2系統は2022年4月に主流株となったが¹¹⁾、流行が続く6月まで主流株であった。7月よりBA.5系統に流行が置き換わり、2023年2月まで8か月間にわたり主流株となっていた。2023年3月よりXBB系統がBA.5系統の検出数を上回り、4月以降は置き換わりが進み主流株となっている。

2. BA.2系統の解析結果

BA.2系統は13,744件検出され、26種類の亜系統に大きく分類された。最も多く検出されたのはBA.2.75系統、次いでBA.2.3系, BA.2.12系となっていた。BA.2系統の検出状況を月ごとに見てみると、6月から8月まではBA.2.3系統, BA.2.12系統を初めとして多くの亜系統が検出された(図

2)。8月よりBA.2.75系統の検出割合が増え、10月以降は7割以上を占めていた。

BA.2.75系統は、BA.2.75.1からBA.2.75.10まで分類されている。さらに、BA.2.75系統およびCH.1.1系統 (BA.2.75.3系統)がVUM (監視下の変異株)として指定されている。都内ではBA.2.75.5, 次いでBA.2.75.3が多く検出されていた。BA.2.75系統の都内初検出株は、7月4日に採取されたBA.2.75.1であった。7月, 8月はBA.2.75.1が多く検出されたが、9月にBA.2.75.5が初めて検出されて以降はBA.2.75.5が主流となっている(図3)。国内ではBA.2.75.5の孫系統であるBN系統が多く登録されており、複数の系統に分けられている⁴⁾。このことから、BA.2.75.5系統は複数の孫系統に変異を続けながら、国内で感染を拡大させていた可能性が考えられる。BA.2.75.3系統では、VUMに指定されているCH.1.1系統が最も多く検出されたが、都内で大きな流行には至らなかった。

3. BA.5系統の解析結果

BA.5系統は96,115件検出され、58種類の亜系統に大きく分類された。最も多く検出されたのはBA.5.2.1系統、次いでBA.5.2系統, BA.5.3.1系統となっていた。BA.5系統は都内では2022年5月から検出され始め¹¹⁾、5月の検出割合は0.2%であったが、6月の検出割合は30%となり、急速に感染が拡大していた。

BA.5.2.1系統は、全期間を通してBA.5系統の5割程度の高い割合で検出された(図4)。BA.5.2.1系統はBF.1から42までの孫系統に分類され、都内でもBF.5を中心に多くの孫系統が検出された。BF系統の中には、世界の検出割合のうち日本が98%以上を超える系統が7系統あることから⁴⁾、国内で変異し感染を拡大させていた可能性が高いと考えられる。

BA.5.3.1系統は10月頃より検出割合が増え、3月以降はBA.5系統の中で最も多く検出された。BA.5.3.1系統もBE系統, BQ.1系統等の多数の孫系統に分類され、都内でもBQ.1.1を中心に多くの孫系統が検出された。都内では9月より3種類のBQ.1系統が検出され、その後12月に最大の73種類のBQ.1系統が検出されていた。このことからBA.5.3.1系統の検出率の増加は、BQ.1系統の多くの孫系統の出現と検出数の増加によるものと考えられる。

4. XBB系統の解析結果

XBB系統は、BJ.1系統 (BA.2.10系統の亜系統)とBM.1.1.1系統 (BA.2.75.3系統の亜系統)の組換え体であり、2022年8月にインドで報告されている¹²⁾。都内においても2022年9月に初めて検出されたことから、海外での発生から約1ヶ月で都内に流入していたと考えられる。

XBB系統は2,556件検出され、21種類の亜系統に大きく分類された。最も多く検出されたのはXBB.1.5系統、次いでXBB.1.9系統, XBB.1.16系統となっていた。2022年10月~12月まではXBB.1系統が主流であったが、XBB.1.5系

表 1. 東京都内で検出された各変異株の亜系統と検出数 (2022 年 6 月～2023 年 5 月)

系統	亜系統・孫系統	2022年						2023年					合計	
		6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月		5月
BA.1	BA.1.1.2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BA.2	BA.2	419	542	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	970
	BA.2.10	183	212	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400
	BA.2.12	268	786	29	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1,087
	BA.2.18	82	623	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	727
	BA.2.24	356	506	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	871
	BA.2.29	236	372	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	614
	BA.2.3	935	993	17	15	51	141	254	103	12	6	9	8	2,544
	BA.2.56	95	283	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	390
	BA.2その他	145	351	15	3	1	0	0	0	0	0	0	0	515
	BA.2.75.1(BL)	0	14	7	2	25	54	81	13	3	0	0	0	199
	BA.2.75.2(CA)	0	0	2	5	16	21	29	1	1	0	0	0	75
	BA.2.75.3(BM,CH等)	0	2	3	4	37	212	445	217	50	18	31	23	1,042
	BA.2.75.4(BR)	0	0	0	0	1	49	158	84	6	3	1	0	302
	BA.2.75.5(BN等)	0	0	0	10	87	770	1,550	989	315	153	58	26	3,958
BA.2.75その他	0	7	16	8	7	2	10	0	0	0	0	0	50	
BA.4	BA.4	19	100	17	2	0	0	0	1	1	0	0	0	140
	BA.4.1	63	420	22	16	1	0	1	0	0	0	0	0	523
	BA.4.2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	BA.4.4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	BA.4.5	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	BA.4.6	0	23	11	21	24	48	13	1	0	0	0	0	141
BA.5	BA.5.1	213	3,250	728	453	416	554	480	185	14	9	0	0	6,302
	BA.5.2	281	7,474	3,650	2,517	1,893	2,291	2,085	498	45	13	0	0	20,747
	BA.5.2.1(BF)	563	9,943	5,139	3,913	4,336	7,628	10,433	4,433	759	130	49	7	47,333
	BA.5.2.6(CP)	0	13	26	58	107	582	1,083	398	68	12	9	0	2,356
	BA.5.2.12	26	718	364	192	122	172	119	127	10	7	0	0	1,857
	BA.5.3.1(BE, BQ)	41	938	239	104	402	2,056	4,164	2,560	486	140	69	8	11,207
	BA.5.5	38	457	116	87	95	256	245	49	5	2	0	0	1,350
その他	44	937	508	481	422	794	1,149	499	86	35	6	2	4,963	
XBB	XBB.1	0	0	0	0	33	41	56	17	2	3	0	0	152
	XBB.1.5	0	0	0	0	0	0	24	47	75	222	355	152	875
	XBB.1.9	0	0	0	0	0	7	7	1	23	122	320	182	662
	XBB.1.11	0	0	0	0	0	0	0	5	1	11	9	0	26
	XBB.1.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	270	224	528
	XBB.1.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	20	23	49
	XBB.2	0	0	0	0	8	10	7	3	0	0	1	0	29
	XBB.2.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	75	65	149
	その他	0	0	0	2	9	21	23	4	3	4	10	10	86
recombi nant	XBF	0	0	0	0	0	22	30	33	12	11	2	0	110
	XAZ	0	35	10	9	2	4	0	2	0	0	0	0	62
	XBC	0	0	0	0	2	6	7	9	4	3	1	2	34
	XBJ	0	0	0	0	0	0	8	14	3	0	0	0	25
	XBQ	0	0	0	0	2	10	7	2	1	0	0	0	22
	XBL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	3	1	13
	その他	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	1	0	6
合計		4,011	29,009	10,978	7,910	8,099	15,751	22,471	10,296	1,985	963	1,299	733	113,505
国内登録数		17,447	57,385	38,338	23,987	20,352	32,677	41,874	26,925	9,830	5,695	3,470	2,050	280,030

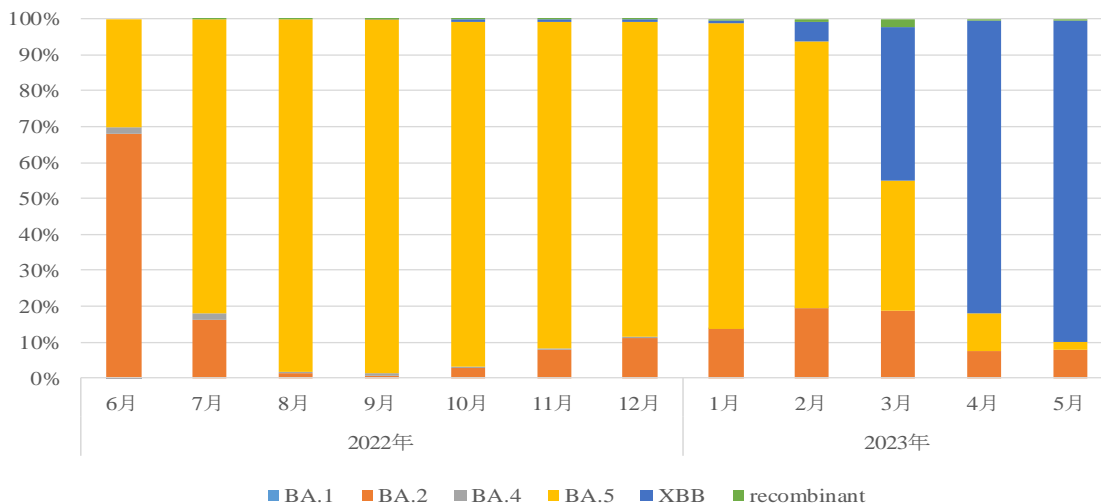


図 1. BA.1, BA.2, BA.4 , BA.5, XBB, recombinant の月ごとの検出割合 (東京都 : 2022 年 6 月 ~ 2023 年 5 月)

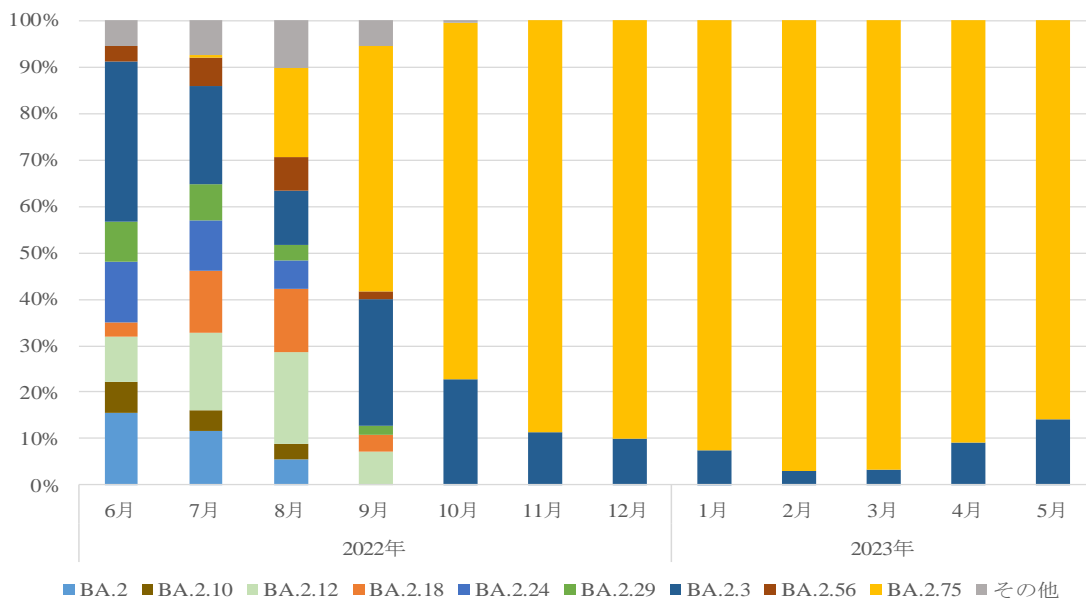


図 2. BA.2 系統の月ごとの検出割合 (東京都 : 2022 年 6 月 ~ 2023 年 5 月)

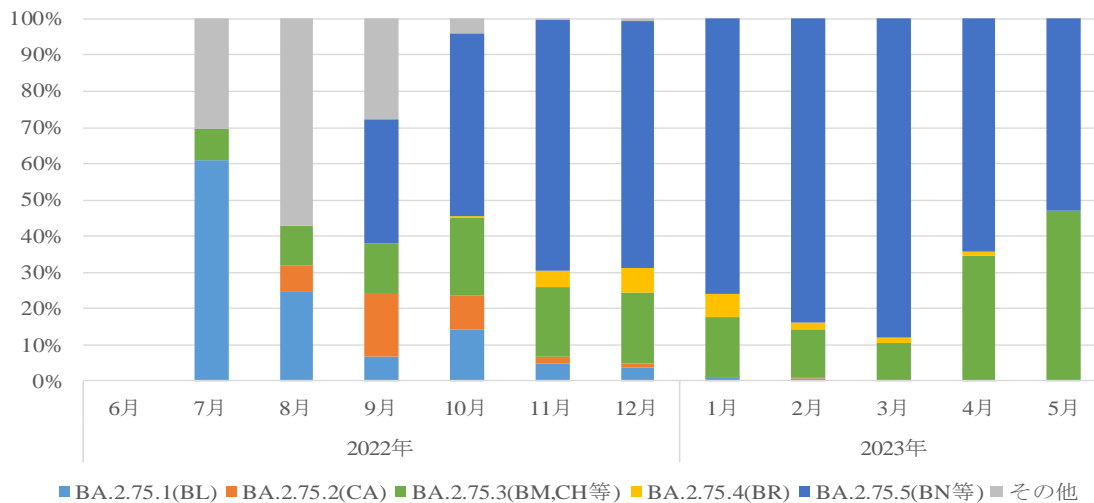


図 3. BA.2.75 系統の月ごとの検出割合 (東京都 : 2022 年 6 月 ~ 2023 年 5 月)

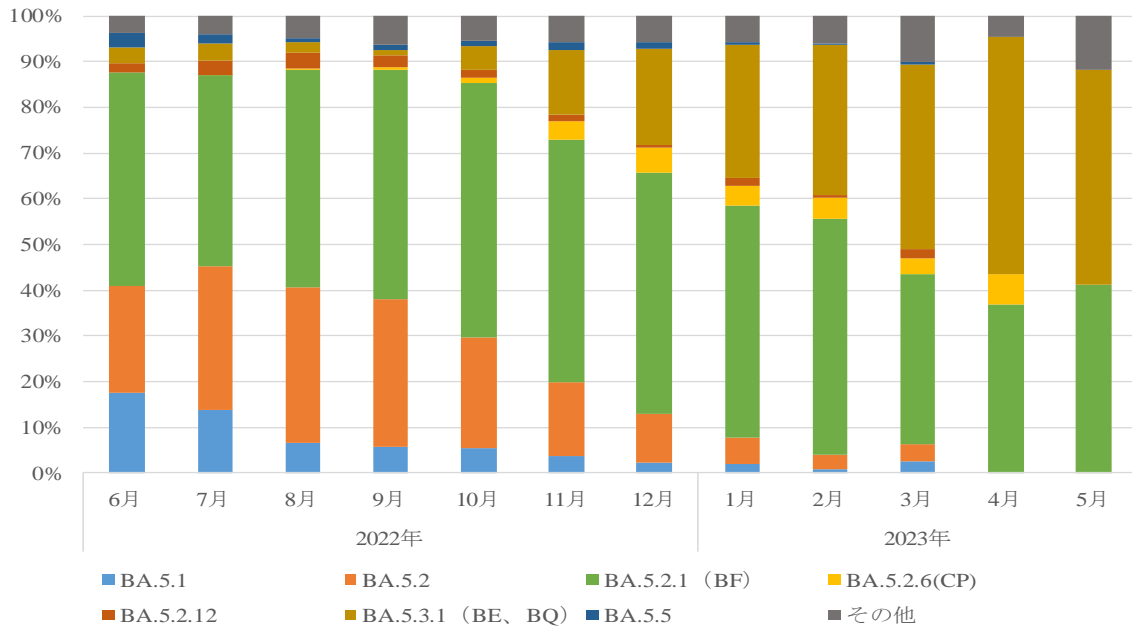


図 4. BA.5 系統の月ごとの検出割合（東京都：2022年6月～2023年5月）

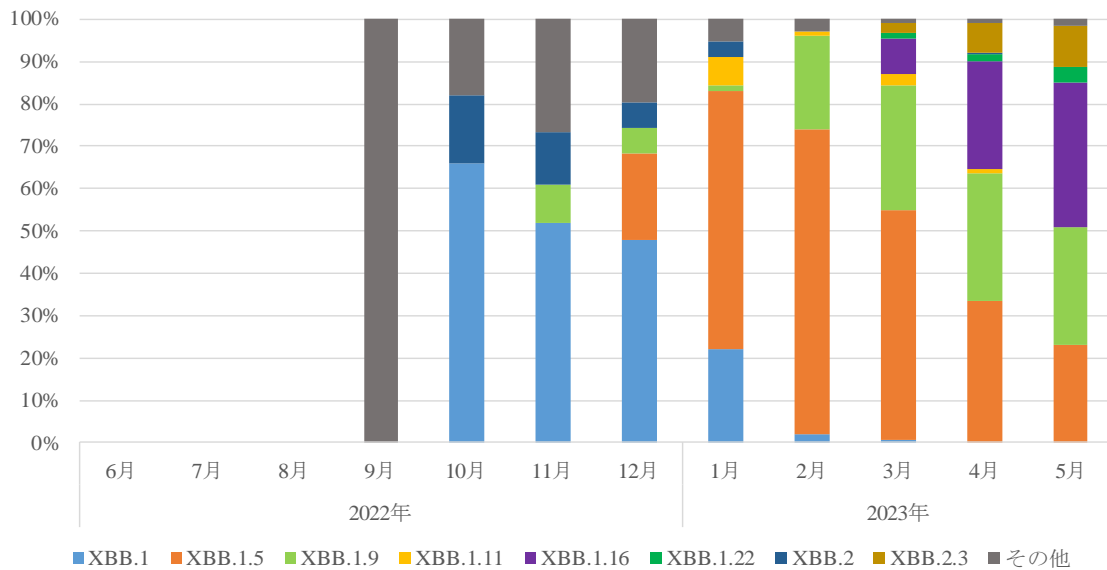


図 5. XBB 系統の月ごとの検出割合（東京都：2022年6月～2023年5月）

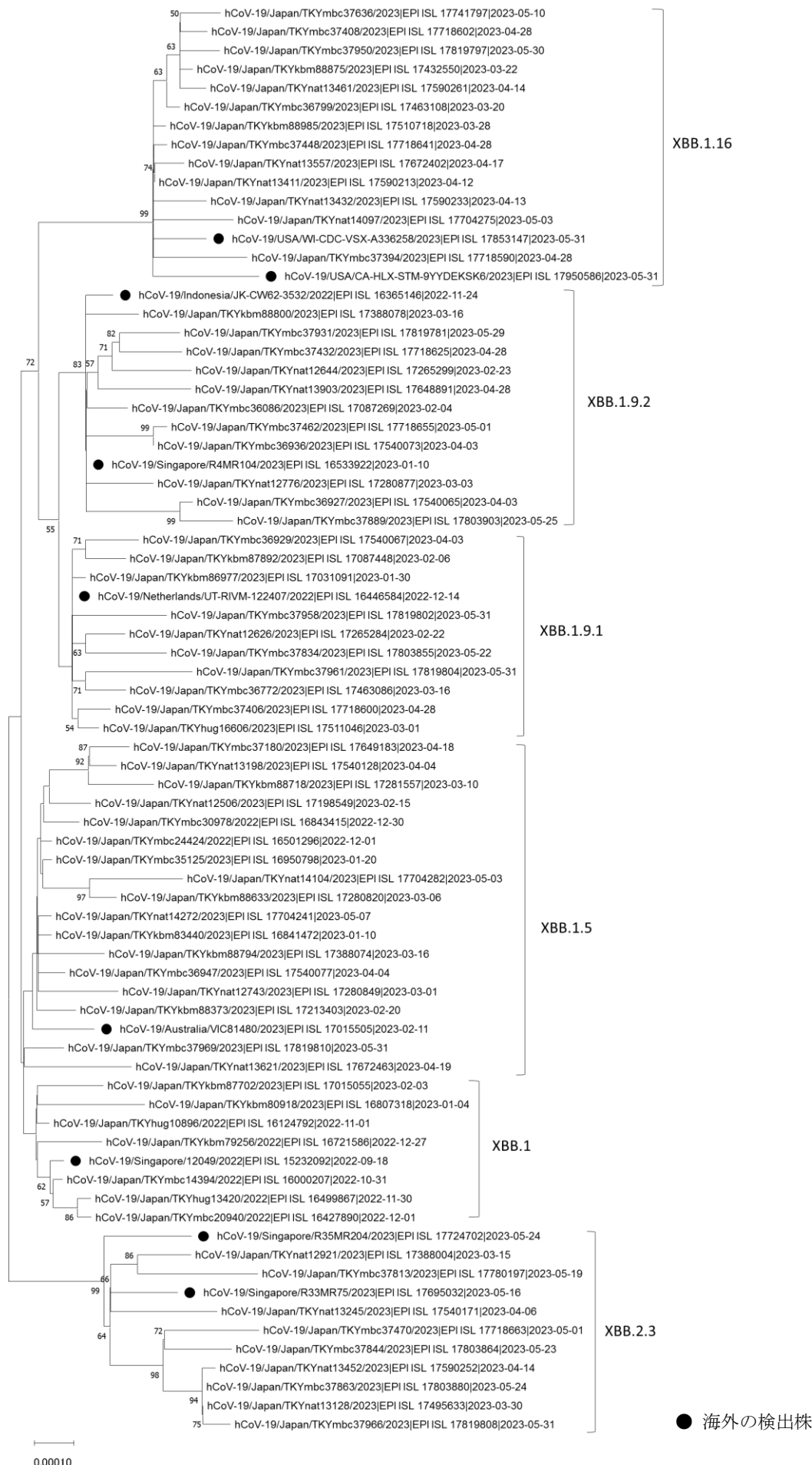


図 6. 東京都内検出の XBB 系統の遺伝子系統樹

統が12月から検出され始めると、2023年1月～4月まではXBB.1.5系統が主流となった(図5)。XBB.1.9系統は2022年11月から検出され始めたが当初の検出数は少なく、2023年2月よりVUMに指定されているXBB.1.9.1系統やXBB.1.9.2系統の孫系統が検出され始めてから、検出割合が急速に増加していた。XBB.1.16系統は、3月に検出された後、検出数が増え、5月はXBB系統の中で最も多く検出された。

XBB系統の中で検出数が多かった5系統(XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.9, XBB.1.16, XBB.2.3)の都内検出株と海外で検出された株を使用し、系統樹解析を行った。その結果、各系統において海外の検出株が都内の検出株と同じクラスターに属し、それぞれ海外株との関連性が示唆された(図6)。また、XBB.1系統(10月から都内で検出)からXBB.1.5系統(12月から検出)が分岐し、XBB.1.9系統(11月から検出)からXBB.1.16系統(3月から検出)が分岐していた。XBB.2.3系統は、XBB.1系統、XBB.1.5系統、XBB.1.9系統、XBB.1.16系統の大きなクレードとは異なるクレードに属した。また、XBB.2.3系統は3月より検出され始め、徐々に検出割合が増えている。VUMに指定されており、シンガポールなどXBB.2.3系統が主流となっている国もあることから¹³⁾、今後の動向に注意が必要と考えられる。

5. BA.1系統, BA.4系統, recombinantの解析結果

BA.1系統は2022年1月、2月に主流となっていたが徐々に検出数が減少し¹¹⁾、6月の1件が都内で検出された最後となった。BA.4系統は、都内では2022年6月より検出され始め2023年2月まで検出されたが、検出数は少なく都内では大きな流行は見られなかった。

XBB系統を除くrecombinant(組み換え体)は2022年3月より検出され始め¹¹⁾、2022年6月以外は毎月検出されていた。10種類の亜系統に大きく分類され、XBF系統、XAZ系統の検出割合が高かったが、検出数は大きく増加せず都内では大きな流行は見られなかった。

ま と め

2022年6月1日から2023年5月31日の間に、当センターおよび民間検査機関において都内のCOVID-19陽性検体113,505件のNGS解析を実施し、GISAIDへ登録した。その結果を集計したところ、2022年6月まではBA.2系統が主流であり、2022年7月から2023年2月まではBA.5系統が、2023年3月以降はXBB系統が主流となっていた。亜系統を集計すると、BA.2系統はBA.2.75.5系統の検出数が最も多く、BA.5系統はBA.5.2.1系統が、XBB系統はXBB.1.5系統が最も多く検出された。XBB系統の系統樹解析では、XBB.1.5系統、XBB.1.9系統、XBB.1.16系統のクレードと、XBB.2.3系統のクレードに大きく分かれた。今後も、SARS-CoV-2の新たな変異株や亜系統の出現が懸念される。引き続きNGS解析を行い変異株の動向をモニタリングし、

都内のCOVID-19流行状況を把握することが重要と考えられた。

文 献

- 1) Wu, F., Zhao, S., Yu, B., *et al.*: *Nature*, **579**, 265-269, 2020.
- 2) Abbas, K., Taimoor, K., Shughla, A., *et al.*: *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **143**, 112176, 2021
- 3) 三宅 啓文, 黒木 絢士郎, 磯貝 まや, 他: 東京健安研七 年 報, **72**, 93-99, 2021.
- 4) Cov-lineages: lineagelist
https://cov-lineages.org/lineage_list.html
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) WHO Tracking SARS-CoV-2 variants.
<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., *et al.*: *Int. J. Infect. Dis.*, **97**, 225-229, 2020.
- 7) Itokawa, K., Sekizuka, T., Hashino, M., *et al.*: nCoV-2019 sequencing protocol for illumina V.5, 2020.
<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-for-illumina-eq2ly398mgx9/v5>
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) Itokawa, K.: Alternative primers for the ARTIC Network's nCov2019 multiplex PCR. 2021.
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primers
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) Kumar, S., Stecher, G., Michael, L., *et al.*: *Mol Biol Evol.*, **35**, 1547-1549, 2018
- 10) 東京都 新型コロナウイルス感染症新規陽性者数
https://www.opendata.metro.tokyo.lg.jp/fukushihoken/130001_tokyo_covid19_patients_per_report_date.csv
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11) 根岸 あかね, 林 真輝, 山崎 貴子, 他: 東京健安研七 年 報, **73**, 115-121, 2022.
- 12) 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)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551cepr/12000-sars-cov-2-27.html>
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 13) Outbreak.info <https://outbreak.info/situation-reports>
(2023年7月7日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Whole-Genome Sequencing Analysis of SARS-CoV-2 in Tokyo (June 2022–May 2023)

Akane NEGISHI^a, Hirofumi MIYAKE^a, Sachiko HARADA^a, Ryota KUMAGAI^a, Fumi KASUYA^a, Ai SUZUKI^a, Hitoshi ITO^a, Arisa AMANO^a, Wakaba OKADA^a, Kenshirou KUROKI^a, Shota YOKOTA^a, Maya ISOGAI^a, Yurie KITAMURA^a, Yukinao HAYASHI^a, Kaori KUZAWA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Yuu YAOITA^a, Miyu KOIZUMI^a, Takushi FUJIWARA^a, Michiya HASEGAWA^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

Many variants of the coronavirus disease (COVID-19), which appeared in China in December 2019, have been reported worldwide. The Omicron variant currently spreading also has subvariants, namely BA.1 to BA.5 and XBB, with each variant having been further classified into several sublineages. To survey and classify the sublineages of SARS-CoV-2 in Tokyo, whole-genome analysis via next-generation sequencing (NGS) has been performed. In this study, 113,505 SARS-CoV-2 genome data analyzed between June 1, 2022 and May 31, 2023 were analyzed, subsequently aggregating the results. In April 2022 to June 2022, the Omicron variant BA.2 strain was dominant. From July 2022 to February 2023, BA.5.2.1 of the BA.5 strains was dominant. After March 2023, XBB.1.5 of the XBB strains was dominant. Phylogenetic tree analysis of XBB strains detected in Tokyo classified them into XBB.1.5, XBB.1.9, XBB.1.16, and XBB.2.3 clades, each of which contained variants abroad. NGS analysis and phylogenetic classification were useful for SARS-CoV-2 variants surveillance in Tokyo.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, next-generation sequencing (NGS), sublineage, phylogenetic tree analysis

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