

新型コロナウイルス変異株B.1.1.529系統（オミクロン株）における 「懸念される変異株における監視下の系統」の全ゲノム情報による解析

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

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の「懸念される変異株」(Variant of Concern; VOC)であるB.1.1.529系統は、伝播を拡大する中で多くの亜系統を生じている。その中で「懸念される変異株における監視下の系統」(VOC-LUM; Variants of Concern lineage under monitoring)に指定されたBA. 2.9.1, BA. 2.11, BA.2.12.1, BA.2.13, BA.2.75, BA.4およびBA.5の7つの亜系統のうち、2022年4月～8月末に都内で5つのVOC-LUMが検出された。それらの全ゲノム配列を国際的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に登録するとともに、各亜系統について近隣結合法による系統樹解析を行い、国内各地域の発生の塩基配列情報と比較した。

その結果、BA.2.12.1では時期の異なる由来から国内に流入し伝播した可能性が考えられた。一方、BA.2.13では同一の系統に由来する一部のクラスターが短期間に速やかに各地域に拡大した影響を反映していると推察された。またBA.2.75では、主に東京を中心とした2つのクラスターと兵庫県の自治体初検出例を含んだ主に関西地方を中心としたクラスターの3つのクラスターに分かれ、異なる起源由来のものから伝播・派生した可能性が考えられた。BA.4とBA.5においてはsublineageのブランチ内に小さなクラスターが多く存在するものの、近い検体採取日でも小クラスター間の距離は離れており、それぞれのクラスターは異なる由来に起源を持ち派生したものである可能性が考えられたが、BA.5.2においては地域性はみられず、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 (SARS-CoV-2), COVID-19, 変異株, GISAID, オミクロン株, VOC-LUM

はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は様々な変異株を生じながら伝播を続けている。変異株B.1.1.529系統は世界保健機関 (WHO) により「オミクロン株」と命名され、2021年11月26日に「懸念される変異株」(Variant of Concern; VOC) に指定されたり。その後WHOはB.1.1.529系統の亜系統BA.xを総称しオミクロン株とすることとしている。

我が国では2021年12月からオミクロン株BA.1が検出され始め、2022年2月ごろにそれまで主要な割合を占めていたデルタ株 (B.1.617.2系統, AY.x) に置き換わった。その後、3月以降はBA.2への置換が進み、さらに6月から7月にかけてBA.5への置換が進行している^{2,3)}。

B.1.1.529系統は世界的に伝播を広げていく中で様々な亜系統を生じたが、WHOは公衆衛生上の懸念が想定される変異を有する特定の株に起因するリスクに対応するため「懸念される変異株における監視下の系統」(VOC-LUM; Variants of Concern lineage under monitoring) という分類を設け、BA. 2.9.1, BA.2.11, BA.2.12.1,

BA.2.13, BA.4, BA.5およびBA.2.75 (追加) の7つの亜系統が該当するとしている (2022年7月12日時点)^{1,4)}。

VOC-LUMを含む亜系統の特定には、次世代シーケンサー (NGS) による全ゲノム解析等が不可欠であり、我が国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を中心としたゲノムサーベイランスを行うことを厚生労働省は2021年2月より求めており⁵⁾、東京都健康安全センター (東京健安研) では積極的疫学調査でSARS-CoV-2検査陽性となった検体について次世代シーケンサー (NGS) を用いて決定した全ゲノム配列を取得し、また都内の感染者に由来するSARS-CoV-2全ゲノム配列を民間検査機関から提供を受けて、これらを併せて国際的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に登録している。

2021年12月～2022年8月末に登録を行ったオミクロン株52,639例のうち、VOC-LUMに含まれる亜系統について国内各地域の発生の塩基配列情報と比較し、近隣結合法による系統樹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
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ウイルス研究科

実験方法

1. 解析対象

2021年12月1日～2022年7月31日に東京健安研に搬入された、東京都内の保健所からCOVID-19に関連した積極的疫学調査においてスクリーニング検査で陽性となった1,685件、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依頼のあった1,326件について、長島ら⁶⁾のプロトコルに従いリアルタイムRT-PCRによる変異株スクリーニング検査を実施し、Ct値が30未満のウイルス量が多かったオミクロン株830検体をNGS解析の対象とした。

また、同期間に民間検査機関がNGS解析を行い、東京健安研にFastaまたはFastqファイルの形式で送付された54,577件のデータのうち十分な情報が得られていた51,809件についてもGISAIDへ登録し系統樹解析の対象とした。

2. NGSによる全ゲノム配列取得

QIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて検体からRNA抽出を行った。ライブラリ作成はItokawaら⁷⁾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.N5またはN6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、Ampure XP (ベックマン・コールター) で精製し、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)を用いてライブラリを作成した。それらを次世代シーケンサー機器 iSeq 100またはMiSeq (Illumina) を用いて全ゲノム配列取得を行った。得られたデータをUbuntu (Canonical Ltd.) 上でItokawaらのPythonプログラム⁷⁾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MEGA7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。

3. 配列データの登録、解析

得られたFastaファイルを用い、Nextclade上 (<https://clades.nextstrain.org/>) で変異解析を行った後、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。登録した配列データ、およびGISAIDに登録されていた既知の配列データについて、MEGA7⁸⁾を用いた近隣結合法 (Neighbor-Joining, NJ) による系統樹解析を行った。

結果および考察

1. 解析で得られたVOC-LUM配列のGISAID登録数

Centre for Genomic Pathogen Surveillanceが作成したソフトウェア Pangolin (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) により付番された分類表記による亜系統別の登録数内訳を表1に示した。東京健安研で検出されたVOC-LUMは14,538件であり、最初に検出されたのは2022年4月27日採取のBA.2.12.1であった。なおVOC-LUMのうちBA.2.9.1とBA.2.11は対象期間中に検出されなかった。

2. BA.2.12.1亜系統の系統樹解析

BA.2の亜系統のBA.2.12.1は、2022年3月中旬に米国東海岸で検出され、6月上旬には米国全体の検出株の6割を占める状態となったVOC-LUMである⁹⁾。BA.2.12.1はスパイクタンパク質 L452Q変異を有しており、従来のBA.2と比較して25%程度の感染者増加の優位性が示唆されているが¹⁰⁾、重症度上昇の証拠はみられていないと報告されている¹¹⁾。

BA.2.12.1について、東京健安研でGISAID登録を行ったデータと他の自治体での検出例のデータのうち無作為に抽出した感染拡大初期の検出例 (検体採取日2022年4月27日～5月31日) 54件に空港検疫由来株、参照株 (Audacy Instant, GISAIDによる自治体初検出例の類似配列、疫学情報は不明) を加えて系統樹を作成した (図1)。空港検疫初検出例 (米国より入国) と自治体初検出例 (東京都) は同一クラスターを形成し、近似した変異を持つ配列や派生した配列によるクラスターが内包されて存在しており、時期の異なる由来 (特定されていない) から国内に流入し伝播した可能性が推察された。

表1. VOC-LUM の GISAID登録数

VOC-LUM Pango系統	登録数	
	全国	うち東京健安研
BA.2.9.1	0	0
BA.2.11	0	0
BA.2.12.1	2,050	753
BA.2.13	98	53
BA.2.75	128	25
BA.4	937	465
BA.5	32,021	13,242
合計	35,234	14,538

* それぞれの亜系統は、より下位の亜系統を包括する

** 集計期間: 2021年12月1日～2022年8月31日

*** 空港検疫による配列情報を含む

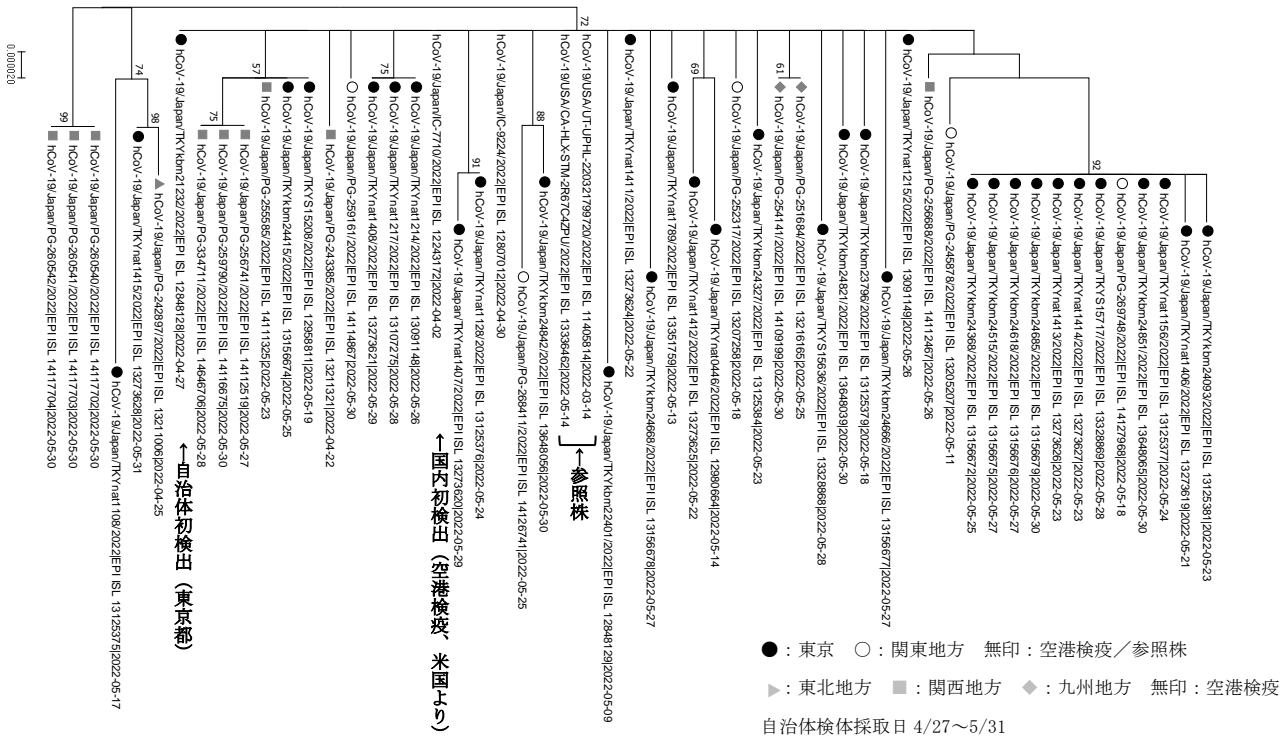


図 1. BA.2.12.1 亜系統の系統樹

3. BA.2.13 亜系統の系統樹解析

BA.2の亜系統のBA.2.13は、ベルギーとオランダでL452Mスパイクタンパク変異が追加された株が確認されてから、欧米諸国において増加傾向となりVOC-LUMとされた。我が国で確認されているBA.2.13は全てL452Mスパイクタンパク変異を有している。

BA.2.13について、東京健安研でGISAID登録を行ったデータと他の自治体での検出例のデータ（検体採取日2022年5月11日～7月27日）から無作為に抽出した79件に空港検疫由来株を加えて系統樹を作成した（図2）。国内の複数の地域（東北・関東・関西）における検出例はいずれも同一クラスターに位置し、それは空港検疫初検出例（UK, アイルランド滞在）と自治体初検出例（神奈川県）が含まれるクラスターとは異なっていた。このことは同一の系統に由来する一部のクラスターが、短期間に速やかに各地域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。

なお、2022年9月8日時点でWHOはVOC-LUMの呼称を“Omicron subvariants under monitoring”に変更するとともに、対象となる亜系統からBA.2.9.1, BA.2.11, BA.2.13を除外している^{1,12)}（変更日非公開）。

また、VOC-LUMではないが同様にL452M変異を獲得したBA.2の亜系統としてBA.2.56.xがある。2021年12月1日～2022年8月31日の期間に、全世界で4,892件のGISAID登録があり、うち4,603件がL452M変異を有していた。我が国では同期間に457件（うち東京健安研45件）の登

録があり、全てがL452M変異を有していた。BA.2.56.xは2022年8月31日時点で海外・国内共に顕著な増加はみられていない。

4. BA.2.75 亜系統の系統樹解析

BA.2の亜系統のBA.2.75は、2022年5月にインドで検出されたVOC-LUMである。BA.2.75はBA.2と比較してW152R, F157L, I210V, G257S, G339H, K417E, G446S, N460Kスパイクタンパク変異を有しており、中和抗体回避の可能性が示唆されている¹³⁾。

BA.2.75について、東京健安研でGISAID登録を行ったデータと他の自治体での検出例のデータ（検体採取日2022年6月24日～8月19日）から無作為に抽出した49件に空港検疫由来株、参照株（Audacy Instant, GISAID）による自治体初検出例の類似配列、疫学情報は不明）を加えて系統樹を作成した（図3）。主に東京を中心とした2つのクラスターと兵庫県の自治体初検出例を含んだ主に関西地方を中心としたクラスターの3つのクラスターに分かれ、異なる起源由来のものから伝播・派生した可能性が推察された。

5. BA.4 亜系統の系統樹解析

BA.4は、2022年1月に南アフリカで検出されたVOC-LUMである。BA.4は後述するBA.5と同じく、BA.2と比較して69/70delation, L452R, F846Vスパイクタンパク変異を有している¹³⁾。

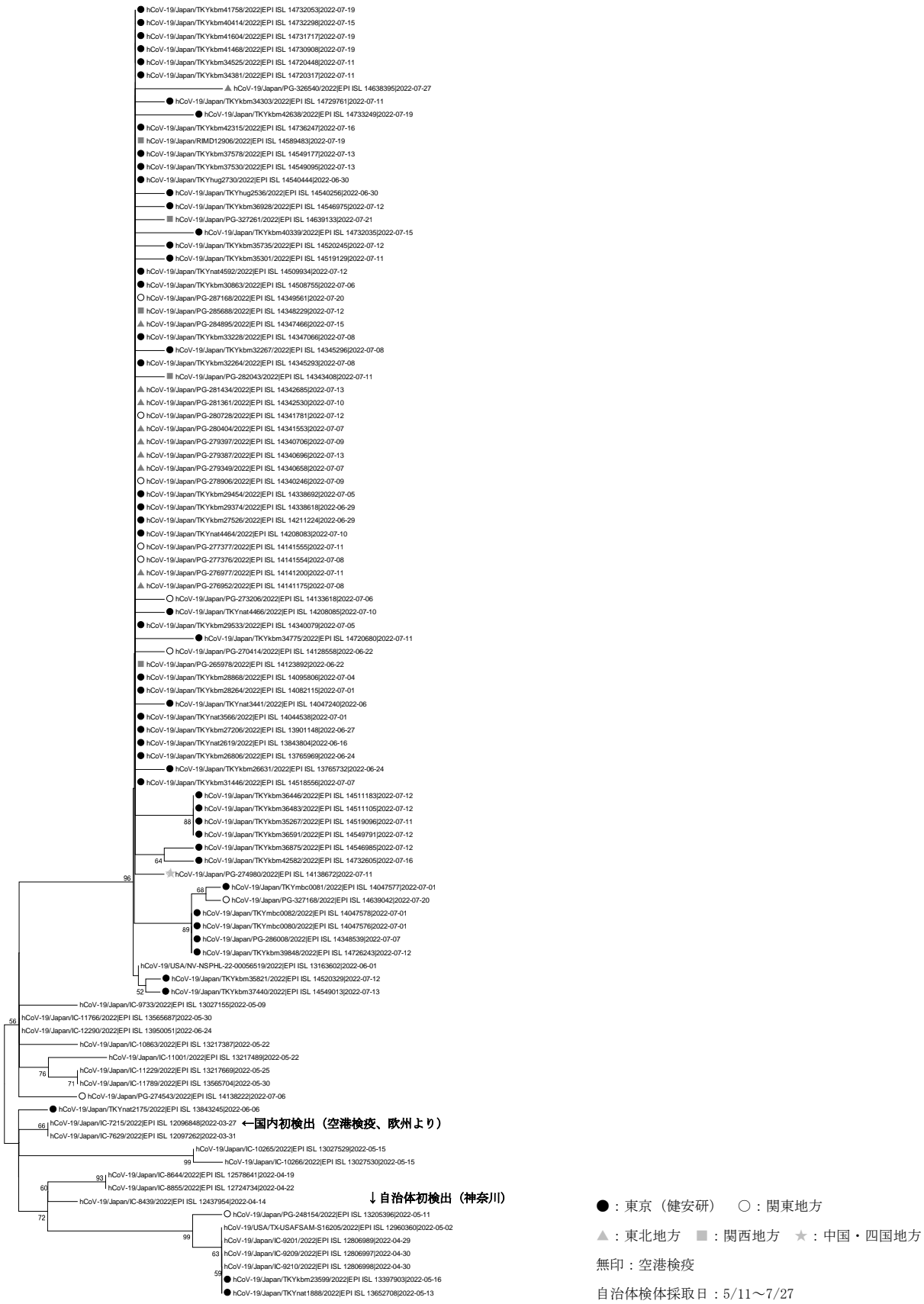


図 2. BA.2.13 亜系統の系統樹

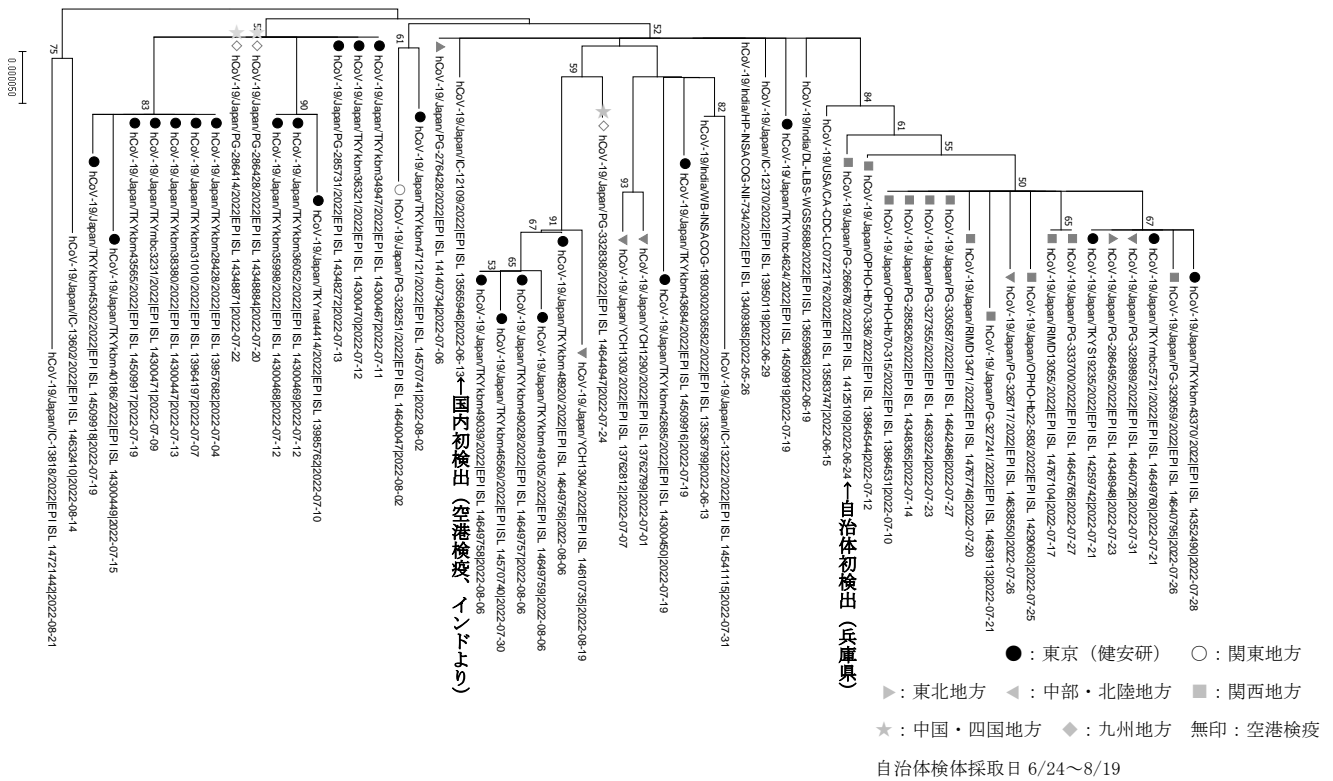


図 3. BA.2.75 亜系統の系統樹

BA.4について、東京健安研でGISAID登録を行ったデータと他の自治体での検出例のデータ（検体採取日2022年6月2日～8月22日）から無作為に抽出した89件に空港検疫由来株、参照株（代表株、疫学情報なし）を加えて系統樹を作成した（図4）。BA.4, BA.4.1, BA.4.6のいずれの亜系統においてもそのブランチ内に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多く存在するもの、地域的な特異性はみられず、検体採取日が近くても小クラスター間の距離は離れている。このことは、それぞれのクラスターは異なる由来に起源を持ち派生したものである可能性が考えられる。

6. BA5亜系統の系統樹解析

BA.5は、2022年1月に南アフリカで検出されたVOC-LUMであり、BA.2と比較してBA.4と同様のスパイクタンパク変異を有している¹³⁾。

BA.5について、東京健安研でGISAID登録を行ったデータと、他の自治体での検出例のデータ（検体採取日2022年5月24日～6月15日）から無作為に抽出した151件に空港検疫由来株を加えて系統樹を作成した（図5）。

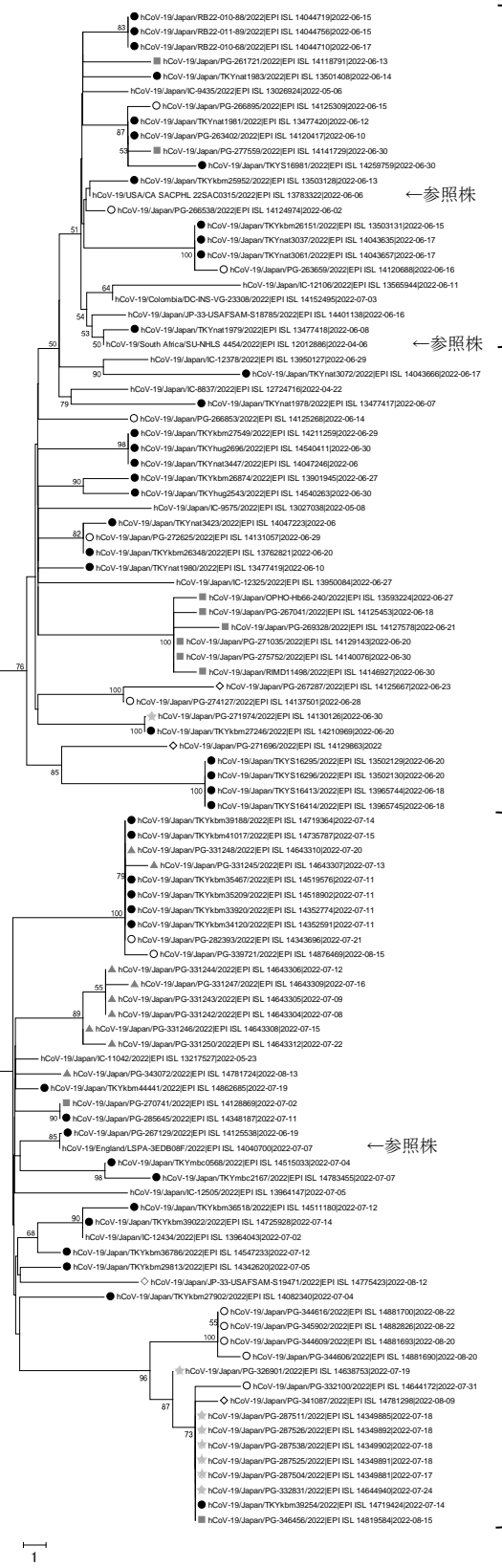
BA.5, BA.5.5, BA.5.6 に関しては、地域的な特異性はみられず、近い検体採取日であっても小クラスター間の距離は離れていた。このことは、それぞれのクラスターは異なる由来に起源を持ち派生したものである可能性が考えられる。BA.5.2.1 では主に東京、九州、沖縄由来

の例で小規模なクラスターがみられた。一方、BA.5.2においても地域性はみられないものの、全体では各配列間の差が小さく、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。

SARS-CoV-2はその伝播の過程で様々な変異株が出現する一方で、それまで趨勢を極めていた変異株が新たな変異株に置き換えられ過去のものとなる様相を繰り返している。かつてVOCに分類され、世界的に憂慮すべき健康被害を引き起こしたアルファ株（B.1.1.7）やデルタ株（B.1.617.2）は、2022年6月7日付でWHOにより「かつて流行していた懸念される変異株」（previously circulating VOC）に分類変更された。VOC-LUMのうち、2022年8月31日時点でBA.2.12.1, BA.2.13, BA.2.75, BA.4はいずれも国内で顕著な増加はみられていないが、BA.5は既存のBA.2に置き換わり³⁾、さらに様々な亜系統を生じている。伝播性、感染性、病原性などが強化した新たな変異株の出現を捉え、脅威となる可能性を把握するため、今後もゲノム解析を継続していく必要があると考えられる。

まとめ

2021年12月1日～2022年7月31日に依頼され東京健安研でNGS解析を実施しGISAIDに登録した830件および民間検査機関が解析し東京健安研でGISAIDに登録した51,809件のオミクロン株のうち、5つのVOC-LUM (BA.2.12.1, BA.2.13, BA.2.75, BA.4および BA.5) 14,538件から無作



● : 東京 (健安研) ○ : 関東地方 無印 : 空港検疫
 ▲ : 東北地方 ▼ : 中部・北陸地方 ■ : 関西地方
 ☆ : 中国・四国地方 ◆ : 九州地方 ◇ : 沖縄
 自治体検体採取日 BA.4 : 6/2~8/22 BA.5 : 5/24~6/15

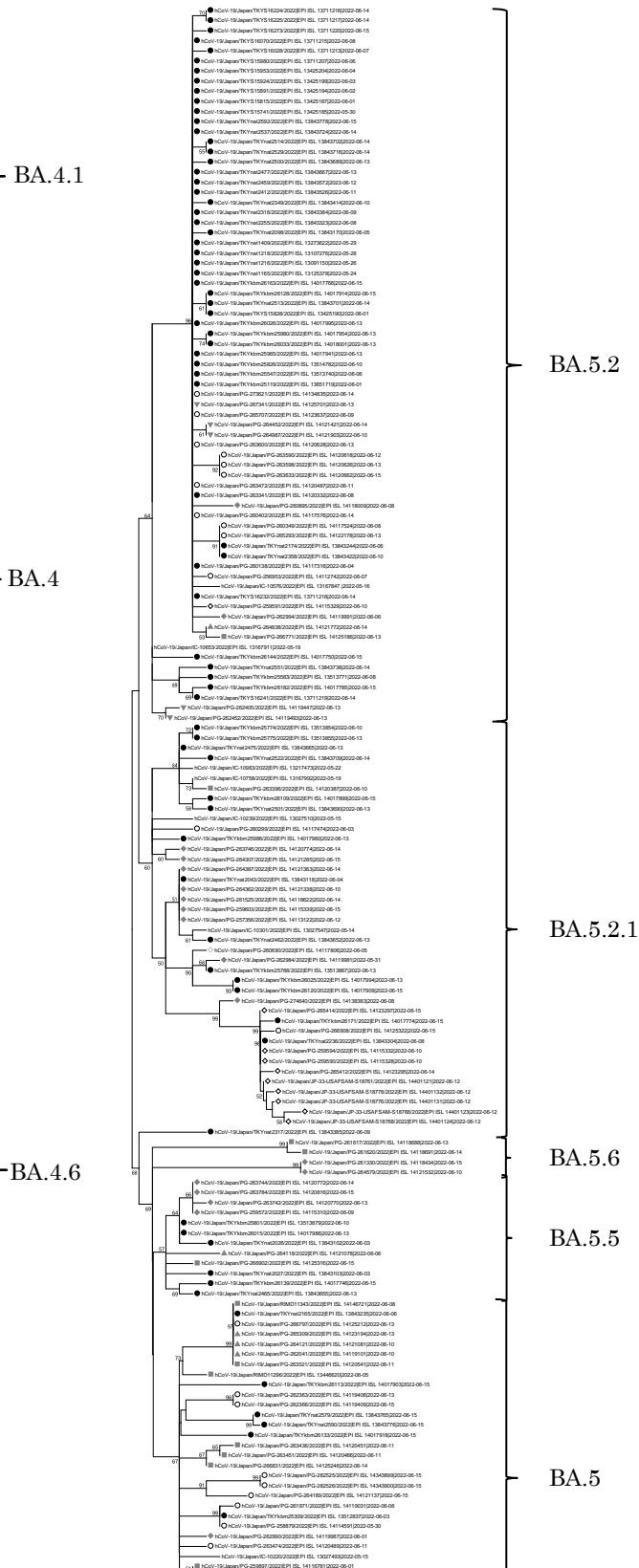


図 4. BA.4 亜系統の系統樹

図 5. BA.5 亜系統の系統樹

為に抽出し、近隣結合法による系統樹解析を行い国内各地域での発生例の塩基配列情報と比較した。その結果、BA.2.12.1では時期の異なる由来から国内に流入し伝播した可能性が考えられた一方、BA.2.13では同一の系統に由来する一部のクラスターが短期間各地域に拡大した影響を反映していると考えられた。また BA.2.75では、主に東京を中心とした2つのクラスターと主に関西地方を中心としたクラスターの3つに分かれ、異なる起源由来のものから伝播・派生した可能性が考えられた。BA.4とBA.5においてはsublinageのブランチ内に小さなクラスターが多くみられ各々は異なる由来に起源を持ち派生したものであろうと考えられたが、BA.5.2においては地域性はみられず、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と推察された。

文 献

- 1) WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
 - 2) covSPECTRUM, <https://cov-spectrum.ethz.ch/>
 - 3) Emma B. Hodcroft. 2021. "CoVariants: SARS-CoV-2 Mutations and Variants of Interest." <https://covariants.org/Nextstrain>, <https://nextstrain.org/ncov/global?l=clock>
 - 4) Dinar, P.: *Med. Sci. Monit.*, **28**, e937676, 2022.
 - 5) 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
 - 6) 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.
 - 7) 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
 - 8) Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.: *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870–1874, 2016.
 - 9) CDC. COVID Data Tracker as of 24 June 2022. <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#variant-proportions>
 - 10) New York State. COVID-19 Data in New York. COVID19 variant data. <https://coronavirus.health.ny.gov/covid-19-variant-data>.
 - 11) WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update, Edition 101, published 20 July 2022. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-july-2022>.
 - 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）の変異株について（第20報）
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11469-sars-cov-2-20.html>
 - 13) 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19報）.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/11346-sars-cov-2-19.html>
- (いずれの文献もURLは2022年8月31日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)

**Phylogenetic Analysis by Whole Genome Sequences of “Variants of Concern Linage under Monitoring”
in SARS-CoV-2 B.1.1.529 Variants; Omicron**

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

Strain B.1.1.529; Omicron, a Variant of Concern (VOC) of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) that is spreading, has given rise to numerous substrains. BA. 2.9.1, BA. 2.11, BA.2.12.1, BA.2.13, BA.2.75, BA.4, and BA.5 were designated as “Lineages under monitoring in variants of concern” (VOC-LUM; Variants of Concern Linage under Monitoring), and 5 VOC-LUM detected in Tokyo between April 2022 and the end of August were ascertained using a next generation sequencer. The complete genomic sequences were registered in the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID), an international open access genome database, and a phylogenetic tree analysis was conducted using the neighbor-joining method and likened with each substrain.

As a result, it was hypothesized that BA.2.12.1 was imported into Japan from a different source and spread there. BA.2.13 may, on the other hand, reflect the influence of some clusters deduced from the same lineage that rapidly expanded to each region in a short period. Furthermore, BA.2.75 was divided into three clusters: two clusters centered primarily in Tokyo and one cluster centered primarily in the Kansai region, which included the first detection cases in Hyogo Prefecture, and the possibility of derivation was regarded. Although there are many small clusters in the sublineage branching BA.4 and BA.5, the distance between the small clusters is long even if the sample collection dates are close, and each cluster originates from a different origin. In BA.5.2, while no regional variations were observed, the overall difference between each sequence was small, reflecting the effect of infection spreading from the same origin in a short period.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, variant, GISAID, omicron, VOC-LUM

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