

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1月～5月)

根岸 あかね^a, 林 真輝^b, 山崎 貴子^c, 三宅 啓文^d, 原田 幸子^a, 熊谷 遼太^a, 鈴木 愛^a, 糟谷 文^a,
黒木 絢士郎^a, 天野 有紗^a, 伊藤 仁^a, 横田 翔太^a, 磯貝 まや^a, 藤原 卓士^a, 長谷川 道弥^a,
森 功次^e, 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,
林 志直^a, 鈴木 淳^e, 長島 真美^a, 貞升 健志^d

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変異株が世界中で報告されている。2022年7月現在, 主流となっているオミクロン株はBA.1からBA.5までの系統があり, 各系統はさらに亜系統に分類されている。新型コロナウイルスの亜系統まで分類するためには, 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。東京都では, 都内でSARS-CoV-2が陽性となった一部の検体でNGSによる全ゲノム解析を実施している。今回, 2022年1月1日から2022年5月31日の間にNGS解析を実施した28,874件をGISAIDへ登録し集計した結果, 1月と2月においてはBA.1系統のうちBA.1.1.2が流行の主流となっていた。3月以降からBA.2系統への置き換わりが進み, BA.2.3.1やBA.2.3, BA.2等の複数の亜系統が流行していた。都内で検出されたBA.2系統の系統樹解析では, BA.2.3とBA.2.3.1のクレードと, BA.2, BA.2.24, BA.2.29のクレードの大きく2つに分かれた。さらに, 3月以降はBA.1系統とBA.2系統の組換え体やBA.5系統などの変異株も出現していた。NGS解析を行い亜系統の分類を集計することで, 都内のCOVID-19の流行状況を詳細に把握することができた。

キーワード: 新型コロナウイルス, 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

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, 瞬く間に世界中に広がったり。国内では2020年1月に最初の患者が確認されて以降, 2022年5月までに6回の感染の波を繰り返し感染が継続している。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波ではオミクロン株が流行している。

オミクロン株には現在, BA.1からBA.5までの系統がある。さらに各系統は多くの亜系統に分類されており, BA.2系統では81までの亜系統が存在する⁴⁾。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, オミクロン株は懸念される変異株 (VOC) に指定されている⁵⁾。さらに, VOCにおける監視下の系統 (VOC-LUM) として, BA.4, BA.5, BA.2.12.1, BA.2.9.1, BA.2.11, BA.2.13, BA.2.75の7系統が指定されている⁵⁾。

VOC-LUMに含まれるBA.2系統は亜系統まで指定されているが, 亜系統まで細かく分類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。厚生労働省は新たな変異株の発生やその動向を監視するために, 地方自治体に対してSARS-CoV-2の全ゲノム解析を5-10%程度実施するよう要請している⁶⁾。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⁷⁾や系統樹解析³⁾等で国際的なゲノムデータベースとして活用されている。

東京都では, 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, 都内でSARS-CoV-2が陽性となった一部の検体でNGSによる全ゲノム解析を実施している。今回は都内のCOVID-19流行状況を詳細に把握することを目的として, 2022年1月から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った。

実験方法

1. 材料

2022年1月1日から2022年5月31日の間に, 健康安全研究センターに搬入されCOVID-19陽性と判断された検体のう

^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食品化学部食品添加物研究科

^c 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

^e 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

ち、Ct値が30未満の検体から抽出した603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28,271件と合わせて、28,874件を集計の対象とした（2022年7月8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⁹⁾に従って行った。すなわち、試料中のSARS-CoV-2の全長RNAを98領域⁹⁾（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⁹⁾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、BA.2系統の5系統（BA.2, BA.2.3, BA.2.3.1, BA.2.24, BA.2.29）を使用し、MEGAXを用いた近隣結合法（Neighbor-Joining, NJ）¹⁰⁾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の確認を行った。クオリティの低いデータを除外した配列について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28,874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、1月が最も多く10,329件、2月が3,812件、3月が4,503件、4月が5,685件、5月が4,545件であった。各変異株の検出数の推移を見ると、1月にはデルタ株からオミクロン株のBA.1系統に置き換わり、3月以降はBA.1系統からBA.2系統へと置き換わりが進んでいた（図1）。

検出された亜系統数を比較すると、BA.1系統は13種類、BA.2系統は21種類の亜系統に分類されていたことから、都内ではBA.2系統はBA.1系統よりも多くの亜系統が存在することがわかった。さらに、BA.2系統の検出された亜系統の種類は、1～3月が6～9種であったが、4月から15種に増加し、5月は最も多い17種の亜系統が検出された。4月から入国制限が大きく緩和されたことにより、海外から国

内へ新たなBA.2系統の亜系統が流入し、4月以降に検出された亜系統の種類が増加した可能性が唆された。

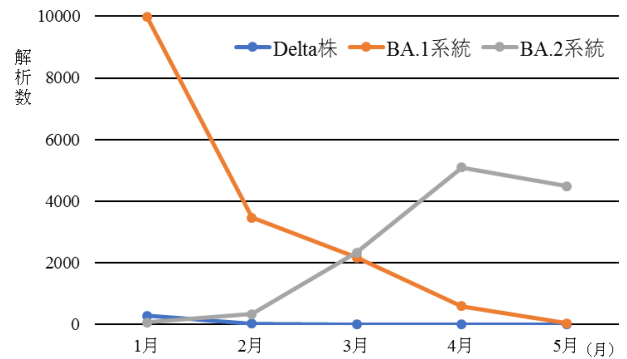


図1. Delta株, オミクロン株 BA.1系統, BA.2系統の月ごとの検出数 (東京都 2022年1月～5月)

2. BA.1系統の解析結果

BA.1系統では13種類の亜系統のうちBA.1.1.2が最も多く検出され、全体の7割を占めていた。次いでBA.1.1, BA.1.1.1, BA.1.15となっている。亜系統ごとの検出割合は、1～4月では大きく変わらなかった（図2）。5月ではBA.1の割合が大きく増加していたものの、全体の検出数は減少していた。

今回の検出結果より、都内の第6波ピーク時（2022年2月2日の21,562人）の流行の主流は、1月と2月に最も多く検出されたBA.1.1.2であったと考えられる。なお、世界で初めてGISAIDに登録されたBA.1.1.2はアメリカで2021年12月6日に採取され（表2）、アメリカは世界における検出の7%を占めている⁴⁾。日本では空港検疫でアメリカに渡航歴のある患者から2021年12月15日に採取されたものが日本で初めてGISAIDに登録され、その後世界における検出の92%を日本が占め、Japan lineageとされている⁴⁾。

3. BA.2系統の解析結果

BA.2系統では21種類の亜系統のうち、検出数が多かったのはBA.2.3.1, BA.2.3, BA.2の3つの亜系統であった。この3つに次いで検出数が多かったのは、BA.2.24とBA.2.29であり、2月から徐々に検出割合が増えている（図3）。また、時期により比率は異なるが、同時に複数の亜系統が流行していた。

検出数が多かった5つの亜系統（BA.2, BA.2.3, BA.2.3.1, BA.2.24, BA.2.29）のうち、BA.2とBA.2.3の国内初の登録株は、2021年12月末に空港検疫で海外に渡航歴のある患者から検出されたものである（表2）。一方でBA.2.3.1, BA.2.24, BA.2.29の3つは、世界で初めて登録されたのは2022年1月中旬以降に茨城県や東京都で採取された株である。さらに、世界における検出の99%以上を日本が占めJapan lineageとされていることから⁴⁾、都内を含め国内を中心に、流行した亜系統であると考えられる。

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 1 月～5 月)

変異株	亜系統	1月	2月	3月	4月	5月	合計
Delta	AY.29	27	0	1	0	0	28
	AY.29.2	249	20	0	0	0	269
	AY.133	2	0	0	0	0	2
Omicron BA.1	BA.1	35	8	8	2	15	68
	BA.1.1	1,984	775	467	159	3	3,388
	BA1.1.1	286	127	146	45	0	604
	BA1.1.2	7,212	2,475	1,493	375	24	11,579
	BA1.1.7	2	0	0	0	0	2
	BA1.1.13	1	1	0	0	0	2
	BA1.1.18	6	1	1	0	0	8
	BA.1.13	1	0	0	0	0	1
	BA.1.15	426	65	50	11	0	552
	BA.1.17	4	0	0	0	0	4
	BA.1.17.2	1	1	1	0	0	3
	BA.1.18	3	2	0	0	0	5
BA.1.20	31	7	2	0	0	40	
Omicron BA.2	BA.2	8	52	362	847	830	2,099
	BA.2.1	0	0	0	2	1	3
	BA.2.2	0	0	1	0	0	1
	BA.2.3	27	83	413	943	936	2,402
	BA.2.3.1	9	54	577	1,207	1,071	2,918
	BA.2.3.2	0	0	0	1	6	7
	BA.2.3.4	0	0	0	1	0	1
	BA.2.5	0	0	0	3	1	4
	BA.2.9	0	0	0	0	7	7
	BA.2.10	10	72	391	541	255	1,269
	BA.2.10.1	0	7	45	75	34	161
	BA.2.10.2	0	3	53	106	109	271
	BA.2.12.1	0	0	0	1	33	34
	BA.2.13	0	0	0	0	2	2
	BA.2.14	0	0	0	1	0	1
	BA.2.18	0	0	0	0	31	31
	BA.2.23	0	0	0	1	0	1
	BA.2.24	1	21	221	716	639	1,598
	BA.2.29	4	38	269	643	528	1,482
BA.2.36	0	0	0	0	1	1	
BA.2.38	0	0	0	0	1	1	
recombinant	XJ	0	0	2	5	0	7
	XT	0	0	0	0	8	8
Omicron BA.5	BA.5	0	0	0	0	10	10
		10,329	3,812	4,503	5,685	4,545	28,874

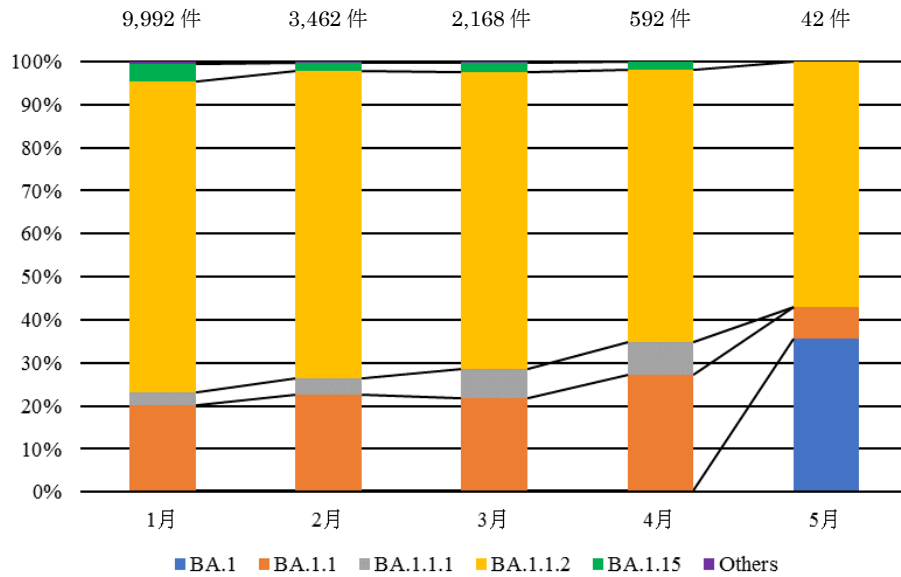


図2. オミクロン株 BA.1 系統の月ごとの各亜系統の検出割合 (東京都 2022 年 1 月～5 月)

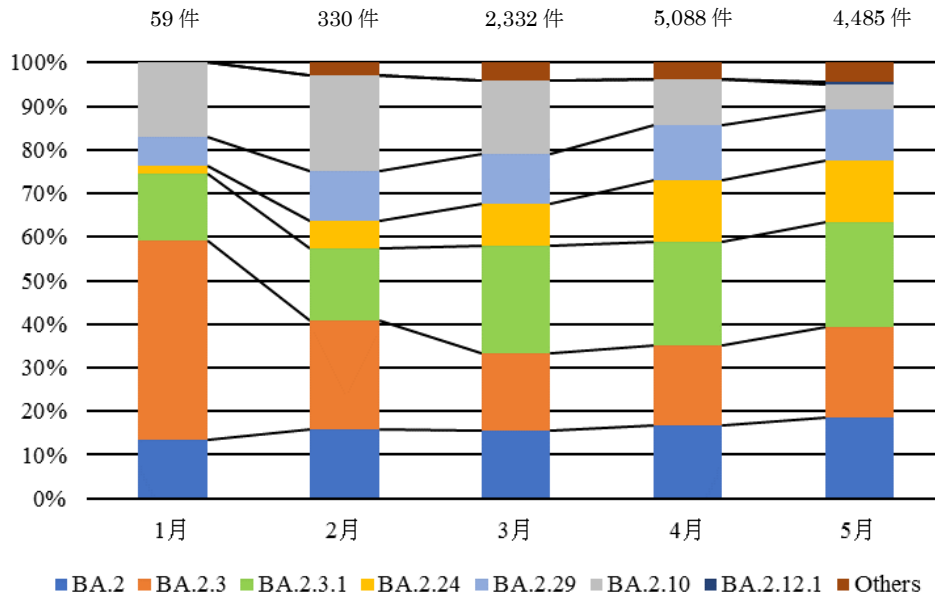


図3. オミクロン株 BA.2 系統の月ごとの各亜系統の検出割合 (東京都 2022 年 1 月～5 月)

表2. 各亜系統の世界および国内において GISAID へ初めて登録された株

亜系統	世界初登録株			国内初登録株		
	株名	採取日	場所	株名	採取日	場所
BA.1.1.2	hCoV-19/USA/HI-H216305/2021	2021/12/6	アメリカ	hCoV-19/Japan/IC-2409/2021	2021/12/15	渡航歴:アメリカ
BA.2	hCoV-19/Scotland/EDB57666/2021	2021/10/22	イギリス	hCoV-19/Japan/IC-2877/2021	2021/12/30	渡航歴:香港、インド
BA.2.3	hCoV-19/Philippines/PH-PGC-102279/2021	2021/12/19	フィリピン	hCoV-19/Japan/IC-2578/2021	2021/12/23	渡航歴:フィリピン
BA.2.3.1	hCoV-19/Japan/PG-186076/2022	2022/1/10	茨城県	同左		
BA.2.24	hCoV-19/Japan/TKYkbm7533/2022	2022/1/27	東京都	同左		
BA.2.29	hCoV-19/Japan/TKYkbm4346/2022	2022/1/17	東京都	同左		
BA.2.12.1	hCoV-19/USA/UT-CDC-2-5847441/2021	2021/12/14	アメリカ	hCoV-19/Japan/IC-7710/2022	2022/4/2	渡航歴:アメリカ
BA.5	hCoV-19/Eswatini/N40393/2022	2022/2/14	アフリカ	hCoV-19/Japan/IC-9093/2022	2022/04/29	渡航歴:スペイン

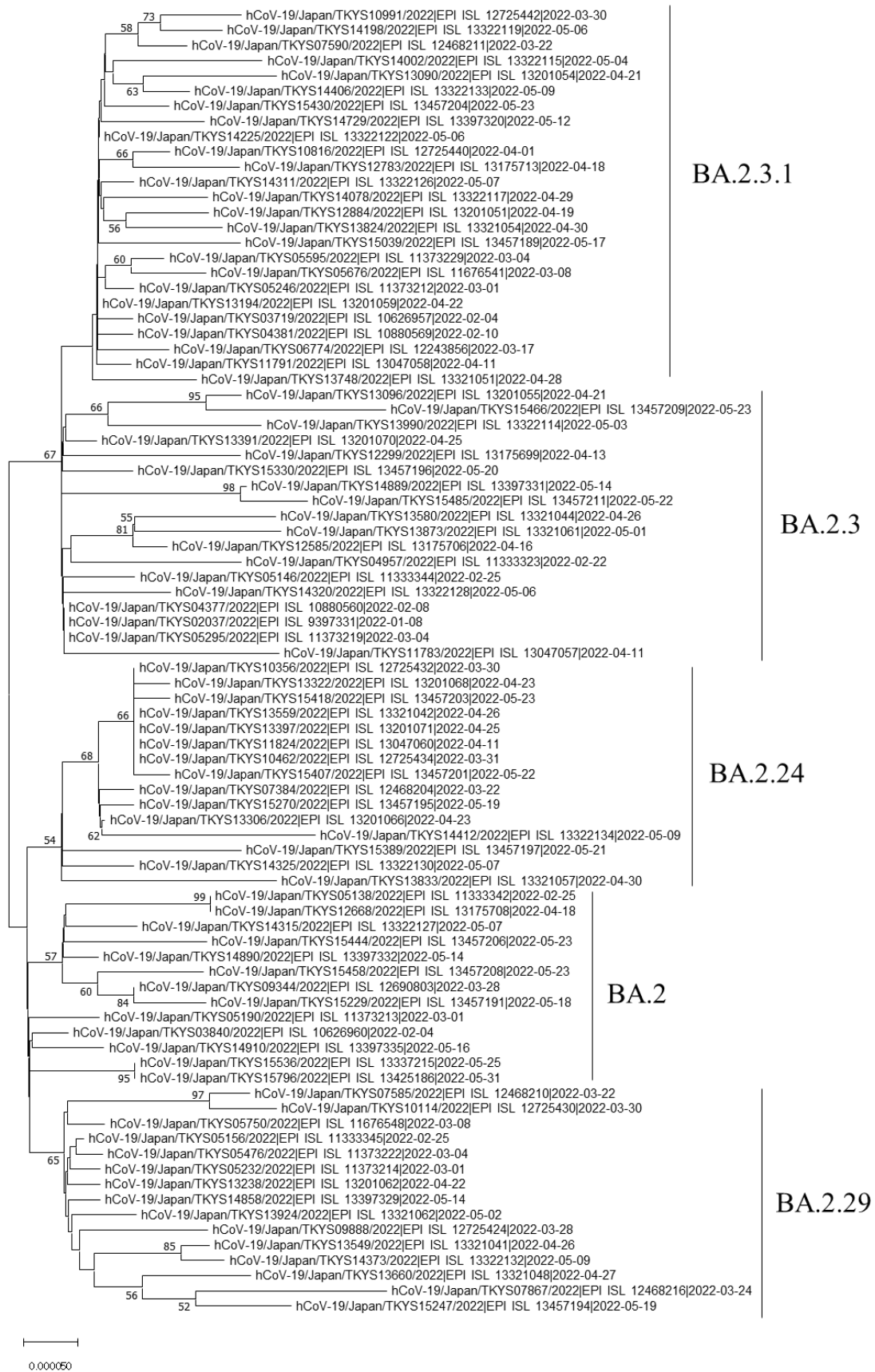


図 4. 東京都内検出の BA.2 系統の遺伝子系統樹

BA.2系統の5つの亜系統を使用した系統樹解析を行った結果、各5つの亜系統でそれぞれクレードを形成した(図4)。また、クレードは大きく2つに分かれ、BA.2.3とBA.2.3.1のクレードと、BA.2, BA.2.24, BA.2.29のクレードに分かれた。

4. 組換え体およびVOC-LUMの解析結果

BA.1系統とBA.2系統の組換え体と、VOC-LUMに指定されているもののうち、BA.2.12.1, BA.2.13, BA.5系統の検出状況を集計した。都内で検出された組み換え体(XT, XJ)は、GISAIDではBA.2またはBA.2.3と判定された。組換え体のXJは、3月と4月に計7件、XTは5月に8件が検出された。XJはフィンランドで、XTは南アフリカで初めて報告されたBA.1とBA.2の組換え体である⁴⁾。今回検出された組換え体は、海外から流入したものか、BA.1系統とBA.2系統の同時感染により国内で発生したものかは不明である。しかし、XJは5月以降に検出されていないことから、都内で感染は拡大していないと考えられた。一方で、XTは5月から検出され始めており、今後の動向に注視する必要がある。

BA.2.12.1は4月と5月に計34件が検出され、うち30件は5月後半に検出された。BA.2.12.1は2021年12月にアメリカで初めて報告され(表2)、アメリカでは今年5月下旬のピーク時に、検出された株の約60%を占めた¹¹⁾。国内では4月2日に空港検疫でアメリカに渡航歴のある患者から初めて検出された。都内では4月後半から検出され始め、5月後半に急増していることから、今後の感染の拡大に注意する必要がある。また、BA.2.13は5月に2件のみ検出された。

BA.5系統は5月に10件が検出された。BA.5系統は2022年2月に南アフリカで初めて検出され(表2)、ポルトガルやフランス、アメリカ等ではBA.2系統からBA.5系統へ置き換わりが進んでいる^{11,12)}。国内では4月29日に空港検疫でスペインに渡航歴のある患者から初めて検出されている。都内では5月から検出され始め5月後半に急増していたことから、国内に流入してから急速に感染が拡大したと考えられる。国内および都内においても今後BA.2系統からBA.5系統へ置き換わりが進む可能性が高いと考えられる。

ま と め

2022年1月1日から2022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28,874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、1月と2月においてはBA.1系統のうちBA.1.1.2が流行の主流となっていた。3月以降からBA.2系統への置き換わりが進み、BA.2.3.1やBA.2.3, BA.2等の複数の亜系統が流行していた。都内で検出されたBA.2系統の系統樹解析では、BA.2.3とBA.2.3.1のクレードと、BA.2, BA.2.24, BA.2.29のクレードの大きく2つに分

かれた。さらに、3月以降は組換え体やBA.5系統などの変異株が徐々に出現していたこともわかった。今後も東京都内において、SARS-CoV-2の新たな変異株や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である。

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
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 5) WHO Tracking SARS-CoV-2 variants.
<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 6) 厚生労働省健康局課長: 健感発0205第4号, 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, 令和3年8月19日一部改正
- 7) Peñarrubia, L., Ruiz, M., Porco, R., *et al.*: *Int. J. Infect. Dis.*, **97**, 225-229, 2020.
- 8) 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>
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 9) Itokawa, K.: Alternative primers for the ARTIC Network's nCov2019 multiplex PCR. 2021.
https://github.com/ItokawaK/Alt_nCov2019_primer_p
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 10) Kumar, S., Stecher, G., Michael, L., *et al.*: *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, 2018
- 11) CDC: covid-data-tracker <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#variant-proportions>
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 12) Outbreak.info
<https://outbreak.info/situation-reports>
(2022年8月15日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性ある)

Whole-Genome Sequencing of SARS-CoV-2 in Tokyo (January-May,2022)

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

Many variants of the coronavirus disease (COVID-19), which first appeared in China in December 2019, have been reported globally. The current omicron variant has subvariants ranging from BA.1 to BA.5, and each variant is further classified into numerous sublineages. Whole genome analysis using next generation sequencing (NGS) is required to classify the SARS-CoV-2 sublineage. NGS analysis is conducted on the SARS-CoV-2-positive specimens subjected to NGS analysis in Tokyo. In this study, GISAID was used to register 28,874 genome data analyzed between January 1, 2022, and May 31, 2022, and the results were aggregated. BA.1.1.2 of the BA.1 strains was dominant in January and February. In March, the dominant strains shifted from BA.1 to BA.2, with multiple lineages present, including BA.2.3.1, BA.2.3, and BA.2. The BA.2 strain discovered in Tokyo was divided into two major clades: the BA.2.3 and BA.2.3.1 clades, and the BA.2, BA.2.24, and BA.2.29 clades. From March to May, many variants appeared, including recombinant strains of BA.1, BA.2, and BA.5. We were able to monitor the SARS-CoV-2 variants in Tokyo by performing NGS analysis and aggregating the lineage classification.

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

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