

ノート

ゲノム分子疫学解析における SARS-CoV-2 (デルタ株) の遺伝子変異および欠損 -三重県- Genetic mutation and deletion of SARS-CoV-2 (Delta strain) in genomic molecular epidemiological analysis -Mie Prefecture, Japan-

矢野拓弥, 北浦伸浩, 中井康博

Takuya YANO, Nobuhiro KITAURA and Yasuhiro NAKAI

キーワード：新型コロナウイルス, デルタ株, SARS-CoV-2, ゲノム解析, NGS

2021年5月～2022年1月に新型コロナウイルス行政検査において, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 陽性となった患者検体を用いてゲノム解析を実施した. このうちデルタ株と確定された629件を調査対象とした. 解析したデルタ株の系統はAY.1系統, AY.24系統, AY.29系統 (AY.29.1系統, AY.29.2系統) およびAY.75.3系統に分類された. 全ての解析例はデルタ株の代表的なアミノ酸変異 (L452RおよびP681R) を含む, 9箇所のアミノ酸変異 (T19R, T95I, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) を保有していた. 特に検出事例の多くが主流となったAY.29系統に属するデルタ株であり, このAY.29系統は複数の異なるアミノ酸変異や欠損が多数確認され遺伝子的に多様化の傾向がみられた. また, AY.29系統における塩基の比較解析では, デルタ株流行の後半に, 塩基置換 (C5365T, C28170T) を基点に系統分岐がみられる特徴があった.

はじめに

2019年12月以降に中国(武漢市)を基点に感染拡大した Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) は, 国内においても2020年1月に感染者が確認された^{1,4)}. 第1波～第3波の流行は, 欧州由来の SARS-CoV-2 の Spike 蛋白質の D614G 変異を代表とするアミノ酸変異ウイルスが主流であった⁵⁾. 2021年春季以降の第4波は, N501Y 変異 (B.1.1.7 系統) を有するウイルスによる流行であった.

2020年末にインド由来とされる B.1.617.2 系統 (デルタ株) は, アミノ酸 (L452R および P681R) の変異^{6,9)} を有し, L452R 変異は, 宿主の免疫回避能力が高まる可能性が示唆されている^{6,7)}. また P681R 変異は細胞性プロテアーゼによって認識・切断される部位の近傍に位置し, ウイルス感染の促進が報告^{8,9)} されている. デルタ株は, 我が国においても2021年4月には初めて確認された¹⁰⁾. 本県では2021年5月に採取した検体からデルタ株が初確認¹¹⁾ され, その後, 同年夏季を中心に国内第5波とされる大規模な流行に至った. 本県で検出された

デルタ株は大部分が同系統の AY.29 に属していた¹²⁾. 以下に, 本県におけるゲノム解析によるデルタ株の系統分類把握とその遺伝子変異等の詳細を報告する.

対象と方法

1. 調査対象

2021年5月～2022年1月に新型コロナウイルス行政検査において, SARS-CoV-2陽性となった患者検体 (鼻汁, 鼻咽頭拭い液, 喀痰, 唾液等) を用い

表1 採取月別のデルタ株 (亜系統) 解析状況

採取月	デルタ株 亜系統						計
	AY.1	AY.24	AY.29	AY.29.1	AY.29.2	AY.75.3	
2021年5月	1						1
6月		1					1
7月			51				51
8月			437	14		3	454
9月			70	8		1	79
10月			21				21
11月			2		1		3
12月							0
2022年1月			1		18		19
計	1	1	582	22	19	4	629

てゲノム解析を実施し、このうちデルタ株と確定された629件を調査対象とした。

採取月別の解析対象者数の内訳は、2021年5月1件、6月1件、7月51件、8月454件、9月79件、10月21件、11月3件、12月0件、翌年2022年1月19件を対象とした。

SARS-CoV-2陽性者の検体は、新型コロナウイルス感染症患者に対する積極的疫学調査実施要領に基づき採取され、医療機関において記入された調査票（患者情報）の使用にあたっては、倫理的配慮として、個人情報保護などに留意し実施した。

2. SARS-CoV-2 の全長塩基配列解析

SARS-CoV-2陽性者の臨床検体からのウイルスRNA抽出には、QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)、MagMAX Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems)を用いた。

SARS-CoV-2の全長塩基配列解析には、糸川らのNext Generation Sequencer (NGS)を用いた新型コロナウイルスのゲノム解析プロトコル¹³⁾に従い、ライブラリー調製を実施した。得られた全長塩基配列を用いて、本ウイルスの系統分類およびハプロタイプ・ネットワーク図の作成を実施し遺伝子情報の共通性等のゲノム解析を実施した。

結果

1. SARS-CoV-2 (デルタ株) の亜系統別検出数

SARS-CoV-2陽性者(デルタ株)629件について、ゲノム解析を実施した。その結果、デルタ株は6種の亜系統に分類された(表1)。

デルタ株における亜系統別の検出状況はAY.1系統(1件)、AY.24系統(1件)、AY.29系統(582件)、AY.29.1系統(22件)、AY.29.2系統(19件)、AY.75.3系統(4件)が検出された。

2. 検体採取月別のデルタ株亜系統分類

ゲノム解析を行ったデルタ株629件について、検体採取月別の系統分類を表1に示した。

当所で初めて検出されたデルタ株(B.1.617.2系統)の派生株であるAY.1系統が2021年5月に1件検出された。6月にはAY.24系統が1件検出され、その後、2021年7月以降にはAY.29系統が主流となり、同年8月を中心に計582件検出された。AY.29系統の月別の検出内訳は2021年7月(51件)、8月(437件)、9月(70件)、10月(21件)、11月(2件)、翌2022年1月(1件)であった。

その他、AY.29系統の派生株であるAY.29.1系統およびAY.29.2系統が確認された。AY.29.1系統は、

2021年8月(14件)、9月(8件)検出された。AY.29.2系統は2021年11月(1件)、2022年1月(18件)検出された。また少数であるがAY.75.3系統は、8月(3件)、9月(1件)検出された。

3. デルタ株亜系統別におけるSpike蛋白質のアミノ酸変異および欠損

ゲノム解析を行ったデルタ株亜系統のSpike蛋白質におけるアミノ酸変異および欠損を表2に示した。全ての解析事例にデルタ株の代表的なアミノ酸変異(L452R, P681R)を含む、9箇所と同変異(T19R, T95I, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N;以下、共通変異)を保有していた。各亜系統別のアミノ酸変異および欠損の詳細は下記のとおりである。

1.1 デルタ株: AY.1系統

2021年5月に検出されたAY.1系統は比較的早期に検出されたデルタ株であったが、前述の共通変異に加え、アミノ酸変異(W258L, K417N)を有していた。しかし、その後検出されたデルタ株の他の亜系統には、同アミノ酸変異は引き継がれていなかった。

1.2 デルタ株: AY.24系統

2021年6月に検出されたAY.24系統は、共通変異に加え、新たなアミノ酸変異(A222V)とアミノ酸(T95I)の欠損がみられた。

1.3 デルタ株: AY.29系統

2021年7月以降主流となったAY.29系統は、大多数(487例)がSpike蛋白質に共通変異のみを有するウイルスであった。また、AY.29系統に分類されるウイルスは、共通変異に加え、複数のアミノ酸変異やアミノ酸欠損が、計39パターン(No.3-42)で確認された。

1.4 デルタ株: AY.29.1系統, AY.29.2系統

AY.29系統のさらなる派生株で、2021年8月から9月に多く検出されたAY.29.1系統と主に2022年1月に検出されたAY.29.2系統のアミノ酸変異の特徴は次のとおりである。AY.29.1系統は共通変異に加え、アミノ酸変異(Q173H)を保有していた。さらに同系統はアミノ酸変異(D80Y + Q173H)、同変異(Q173H + M1237I)および同変異(Q173H + V1264L)を有するウイルスが確認された。

また、AY.29.2系統は、共通変異に加えて、アミノ酸変異(Q414R)の特徴を有していた。

1.5 デルタ株: AY.75.3系統

表2 デルタ株亜系統のアミノ酸変異および欠損

No.	解析数	デルタ株亜系統	代表的なアミノ酸 (変異および欠損 + 共通アミノ酸変異*)
1	1	AY.1	W258L、K417N
2	1	AY.24	AY.24 (A222V)、T95I (欠損)
3	487	AY.29	共通アミノ酸変異のみ**
4	1	AY.29	A243S
5	2	AY.29	A520S、V1228L
7	1	AY.29	A520S、V1228L、D950N (欠損)
8	3	AY.29	A623T
9	1	AY.29	A846G
10	1	AY.29	A879V
11	1	AY.29	D215G
12	1	AY.29	D253G
13	9	AY.29	D796N
14	2	AY.29	G142D (欠損)
15	1	AY.29	D950N (欠損)、E1207D
16	1	AY.29	E1150D
17	1	AY.29	G181V
18	14	AY.29	E1207D
19	1	AY.29	G1099D、D1260Y
20	1	AY.29	I332V
21	2	AY.29	I818V
22	1	AY.29	K529R
23	1	AY.29	L517F
24	2	AY.29	L54F
25	1	AY.29	L54F、L141F、V1228L
26	5	AY.29	L5F
27	1	AY.29	L5F、E1207D
28	1	AY.29	N1074D
29	1	AY.29	N501S
30	1	AY.29	Q1071H
31	4	AY.29	Q613H
32	9	AY.29	R237S
33	6	AY.29	R408I
34	1	AY.29	S221L
35	1	AY.29	S256L
36	3	AY.29	S640F
37	2	AY.29	T19R (欠損)
38	1	AY.29	T883I
39	7	AY.29	V1228L
40	1	AY.29	V483F
41	2	AY.29	V83F
42	1	AY.29	Y248C、G257C
43	18	AY.29.1	Q173H
44	1	AY.29.1	D80Y Q173H
45	1	AY.29.1	Q173H、M1237I
46	2	AY.29.1	Q173H、V1264L
47	19	AY.29.2	Q414R、
48	4	AY.75.3	T95I (欠損)、A222V、P251L
計	629		

* No.1~48, 全てのデルタ株亜系統で共通アミノ酸変異 (T19R, T95I, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) を保有する。

** No.3は共通アミノ酸変異 (T19R, T95I, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) のみを保有する。

2021年8月に検出されたAY.75.3系統は、共通変異に加え、新たなアミノ酸変異 (A222V, P251L) を有し、さらに同欠損 (T95I) がみられた。

4. AY29系統における塩基置換の比較

デルタ株亜系統はAY.1系統, AY.24系統, AY.29系統 (AY.29.1系統, AY.29.2系統) およびAY.75.3

系統が検出された。特にAY.29系統は、さらに細分化がみられAY.29.1系統, AY.29.2系統の2種の亜系統が確認された。このAY.29系統に属する同系譜のデルタ株について、塩基置換に関する比較解析を実施した。

ゲノムネットワーク解析図上の分類 (図1) で、AY.29系統において分類上の指標となる塩基置換

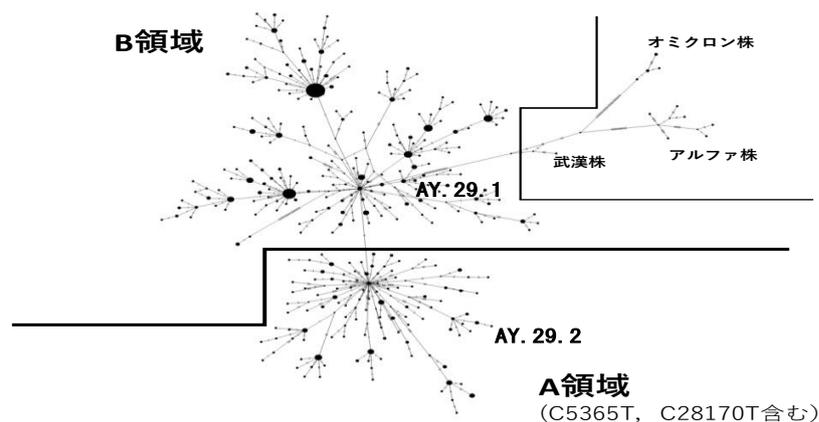


図1 SARS-Cov-2 デルタ株(AY.29) ゲノムネットワーク解析図 (2021年5月～2022年1月)

はC5365T, C28170Tであった。このことにより本解析図においてAY.29系統 (AY.29.1系統, AY.29.2系統を含む) の塩基置換 (C5365T, C28170T) の有無により、便宜上、A領域およびB領域と定義した。A領域は当該の塩基置換 (C5365T, C28170T) を有し、B領域は保有しないウイルスである。AY.29系統は、A領域およびB領域の2領域に分類され、一方でこの系譜を踏む派生株であるAY.29.2系統はA領域に属し、AY.29.1系統はB領域に位置づけられた。

考察

SARS-CoV-2のゲノムサーベイランスは、新たな系譜の監視と流行動態に関わるウイルスの流入および拡散等を把握し、感染リンクの繋がりを追跡する目的で実施されている。これまでの新型コロナ渦の対策として本サーベイランスが活用され、有用性が示されてきた¹⁴⁻¹⁶⁾。

今回、第5波の流行に関与したデルタ株のSpike蛋白質におけるアミノ酸変異を明らかにし、全ての解析事例においてデルタ株の代表的なアミノ酸変異 (L452R, P681R) を含む、9箇所共通のアミノ酸変異と新たなアミノ酸変異および同欠損が確認された。なかでも、検出事例の多くがAY.29系統でデルタ株において主流となった系統であったが、さらに複数の異なるアミノ酸変異や欠損が多数確認され遺伝的に多様化の傾向がみられた。このAY.29系統は、さらなる分岐がみられ、2021年晩夏から初秋のデルタ株流行の終盤に関与したAY.29.1系統と翌2022年1月に多く検出されたAY.29.2系統は、AY.29系統と一部異なるアミノ酸変異を有しており差異がみられた。AY.29.1系統は共通変異に加え、Q173H変異を軸に有するアミノ酸変異 (D80Y + Q173H, Q173H + M1237I, Q173H

+ V1264L) に属する群がみられたが、その後、AY.29.2系統に置き換わり、この系統はアミノ酸変異 (Q414R) を保有する系統群であった。しかし、その後の世界的なオミクロン株への流行シフト¹⁷⁻²⁰⁾により、デルタ株自体が検出されておらず、本変異 (Q414R) を有するウイルスとともに消滅に至った。

第5波の主流であったAY.29系統は、デルタ株流行の中心の時期であった2021年8月から9月にかけて同系統の検出が集中していた。前述のとおり、本系統はアミノ酸変異や欠損が多数あり、遺伝的に多様化を示したが、8月から9月の僅か2ヶ月間における採取時期に起因する変異や流行状況など明確な差異およびその識別は困難であった。しかしながら、傾向としてデルタ株流行の後半に検出された本系統は塩基置換 (C5365T, C28170T) を有するウイルスであることが読み取れた。その後、塩基置換 (C5365T, C28170T) を基点に系統分岐が進み、2022年1月に複数検出された同塩基置換を有するAY.29.2系統への移行が進んでいたがオミクロン株への流行シフトにより、同系統は小規模な流行に留まったものと考えられる。

これらの複数のアミノ酸変異あるいは同欠損による遺伝的に多様化の一因として、感染者数の増加により、ヒトからヒトへの感染機会が増すことで、変異効率の上昇へ転じたものと考えられ、すなわち、変異リスク回避あるいは低減には感染拡大抑制対策の徹底による流行規模の縮小が鍵となるものと思われる。

謝辞

SARS-Cov-2のゲノム解析に関して、情報提供して頂きました国立感染症研究所病原体ゲノ

ム解析研究センターの諸先生方に深謝いたします。

新型コロナウイルス感染症に対する積極的疫学調査において検体採取を担当された医療機関の諸先生方、保健所等の関係各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：日本国内の新型コロナウイルス感染症第一例を契機に検知された中国武漢市における市中感染の発生, 病原微生物検出情報, **41**, 143-144(2020).
- 2) 国立感染症研究所：国内で報告された新型コロナウイルス感染症確定例12例の記述疫学(2020年2月3日現在), 病原微生物検出情報, **41**, 48-49(2020).
- 3) 国立感染症研究所：国内初の新型コロナウイルスのヒト-ヒト感染事例, 病原微生物検出情報, **41**, 63-64(2020).
- 4) 厚生労働省：新型コロナウイルスに関連した肺炎の患者の発生について(10例目)
https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_09236.html (2022.11.10 access)
- 5) 矢野拓弥, 永井佑樹, 楠原 一, 他新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)におけるアミノ酸変異(D614G)を有するウイルスの動向について-三重県-(2020年1月~2020年9月), 三重保環研年報, **22**(通巻第65号), 57-62(2020).
- 6) Veronika Tchesnokova, Hemantha Kulakesara, Lydia Larson, et al: Acquisition of the L452R mutation in the ACE2-binding interface of Spike protein triggers recent massive expansion of SARS-Cov-2 variants, bioRxiv, 2021, doi:<https://doi.org/10.1101/2021.02.22.4321> (2022.11.20 access)
- 7) Pragya D Yadav, Gajanan N Sapkal, Priya Abraham, et al : Neutralization of Variant Under Investigation B.1.617.1 With Sera of BBV152 Vaccinees, Clin Infect Dis, 2021, doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciab411> (2022.11.20 access)
- 8) Davide Zella, Marta Giovanetti, Francesca Benedetti et al. Review The variants question: What is the problem? J Med Virol, 1-7(2021).
- 9) 増田道明：新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の変異, モダンメディア 67巻(10号), 413-420 (2021).
- 10) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2の変異株 B.1.617系統の検出について
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-lab-2/10326-covid19-43.html>(2022.11.10 access)
- 11) 矢野 拓弥, 永井 佑樹, 楠原 一, 他三重県におけるアミノ酸変異(N501Y, L452R) を有する新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の経時的検出状況とその他のアミノ酸変異(E484K, F490S, L452Q)の動向 , 三重保環研年報, **23**(通巻第 66 号) , 53-56(2021).
- 12) 矢野拓弥, 北浦伸浩, 中井康博：三重県における新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のゲノム分子疫学調査(2020年1月~2021年10月), 三重保環研年報, **23** (通巻第 66 号), 48-52(2021).
- 13) 糸川健太郎, 関塚剛史, 橋野正紀 他：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Qiagen 社 QiaSEQ FX 編- version 1.4 (2022/01/22)
https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/SARS-CoV2_genome_analysis_manual_QIASEQFX_ver_1_2_211006.pdf(2022.11.10 access)
- 14) 国立感染症研究所：主に保護者の感染から疑われた新型コロナウイルス感染症(デルタ株)の複数地域の保育所における集団感染事例, 2021年10~11月, 病原微生物検出情報, **43**, 122-123(2022).
- 15) 国立感染症研究所：2021年5~6月にかけて関東地方で発生した新型コロナウイルス B.1.617.2(デルタ株)症例に関する実地疫学調査で得られた2つの製造業事業所の対策に関する考察, 病原微生物検出情報, **43**, 145-146(2022).
- 16) 塚越博之, 篠田大輔, 齋藤麻理子 他：群馬県において検出されたSARS-CoV-2デルタ株関連症例からみえた課題(2021年5月13日~10月12日), 病原微生物検出情報, **43** , 147-149 (2022).
- 17) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2の変異株 B.1.1.529系統について(第1報)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10790-cepr-b11529-1.html>(2022.11.10 access)
- 18) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2の変異株 B.1.1.529系統について(第2報)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10792-cepr-b11529-2.html>(2022.11.10 access)
- 19) 厚生労働省：オミクロン株の国内発生状況について,
https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_23133.html(2022.11.10 access)
- 20) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2の変異株 B.1.1.529系統(オミクロン株)について(第8報)
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2551-cepr/10989-cepr-b11529-8.html>(2022.11.10 access)