

福井県における新型コロナウイルスの全ゲノム解析について

坂井伸成・高橋美帆・小和田和誠・東方美保

Whole genome sequencing analysis of SARS-CoV-2 in Fukui Prefecture

Nobushige SAKAI, Miho TAKAHASHI, Kazuaki KOWADA, Miho TOHO

1. 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た重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（以下、「SARS-CoV-2」）を病原体とする感染症である。

福井県では2020年3月に初の感染者が報告されて以降、2022年3月末までに21,281名の陽性者が報告されている。

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター（以下、「感染研病原体ゲノム解析センター」）では、国内流入当初からSARS-CoV-2の流行拡大と変異等を監視するため、全ゲノム解析を行っている。当県も2020年3月から感染研病原体ゲノム解析センターに検体から抽出したRNAを送付し、全ゲノム解析を依頼していた。感染研病原体ゲノム解析センターからの次世代シーケンサー貸与および解析サポートを受けて、2021年8月からは、福井県衛生環境研究センター（以下、「当センター」）でSARS-CoV-2の全ゲノム解析を行っている。今回は令和3年度に当センターで実施したSARS-CoV-2の全ゲノム解析について報告する。

2. 方法

2.1 検体の選定

当センター、医療機関または民間検査機関における遺伝子検査でSARS-CoV-2陽性で、全ゲノム解析に十分なゲノム量が含まれると推定される検体の一部と、福井県新型

コロナウイルス感染拡大防止対策チーム（以下、「対策チーム」）から依頼のあった検体を検査対象とした。

対策チームにおいては、疫学情報に基づく推定感染経路により、感染系統別に流行状況を解析していた。そこで、感染系統を代表する検体のうち、変異検出系で流入監視が必要な新たな変異株と考えられる検体を優先して選定した。

その結果、対象となったのは、2021年7月26日（2021年第30週）から2022年3月27日（2022年第13週）までに採取された検体の合計527検体であった。検体採取週別の全ゲノム解析数および福井県内SARS-CoV-2陽性者の推移を図1に示す。

なお、全ゲノム解析に十分なゲノム量が含まれる目安は、Ct値27未満とした。Ct値は、当センターで実施したTaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix [Thermo Fisher Scientific]を用いたSpike L452R変異の検出系¹⁾もしくはSARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit[タカラバイオ]²⁾を用いた逆転写-リアルタイムPCR法により算出した。

2.2 全ゲノム解析

核酸抽出物からNGS解析用ライブラリーを作成し、全ゲノム配列を確定した。すなわち、核酸は国立感染症研究所の病原体検出マニュアル「2019-nCoV」³⁾に沿ってQIAamp Viral RNA mini kit[Qiagen]を用いて抽出した。ライブラリー作成方法および試薬は、国立感染症研究所のプロトコル⁴⁾を用いた。検体中のSARS-CoV-2の全長RNAを98領域のMultiplexPCRで増幅したものを、ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit[NEB]を用いライブラリーを

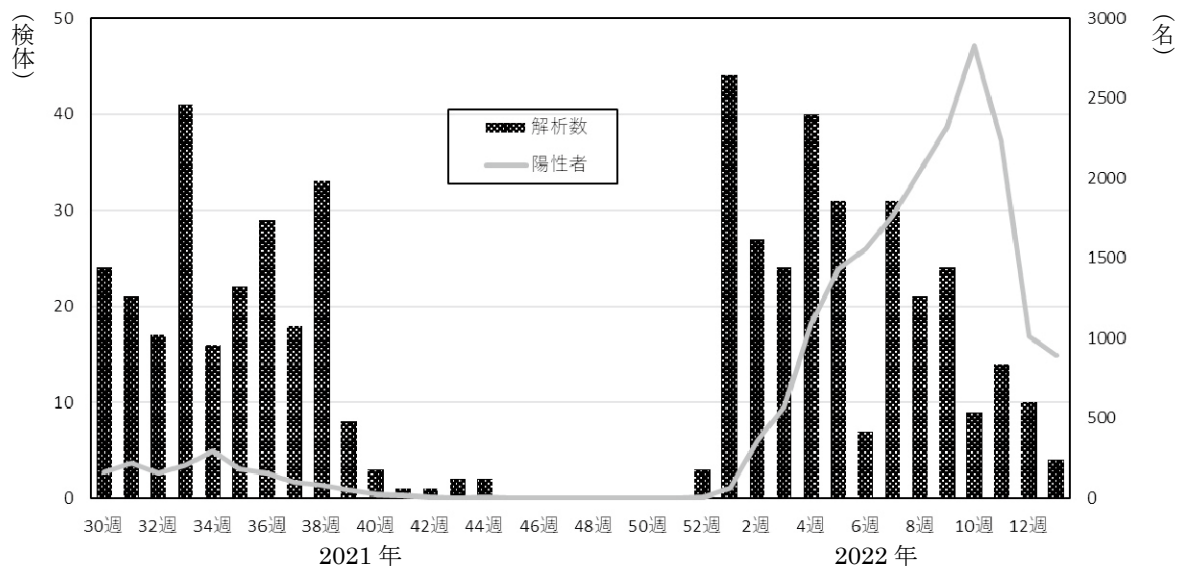


図1 全ゲノム解析数とSARS-CoV-2陽性者の推移

作製した。MultiplexPCR のアニーリング温度については、当初は 61℃、2022 年 1 月以降は 60℃で処理を行った。感染研病原体ゲノム解析センターから無償貸与された次世代シーケンサーNanopore Mk1c[Oxford]を使用し取得したデータを、感染研病原体ゲノム解析センターが開発したゲノム情報解析プラットフォームである COG-JP (COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan)で解析した。得られた塩基配列を使用し、Pop Art version 1.7⁵⁾ [University of Otago Popart]を用いてハプロタイプネットワーク図を中国・武漢発 (Wuhan-Hu-1,2019/12/26 分離,GenBank, ID : MN908947) のゲノム情報を原点 (REF) として、Median-joining 法により作図した。

3. 結果および考察

3. 1 解析結果

解析結果は、アルファ株 10 検体、デルタ株 235 検体、オミクロン株 (BA.1) 270 検体、オミクロン株疑い (BA.1) 1 検体、オミクロン株 (BA.2) 5 検体、判定不能 6 検体であった。図 2 は検体採取週毎の解析結果であり、図 3 には検出割合を示す。今回ゲノム解析を行った検体の採取期間は、県内の感染拡大第 5 期 (2021 年 7 月 20 日から 12 月 27 日) から第 6 期 (2021 年 12 月 28 日から 6 月 30 日) にあたる。第 5 期はデルタ株、第 6 期はオミクロン株が多かった。

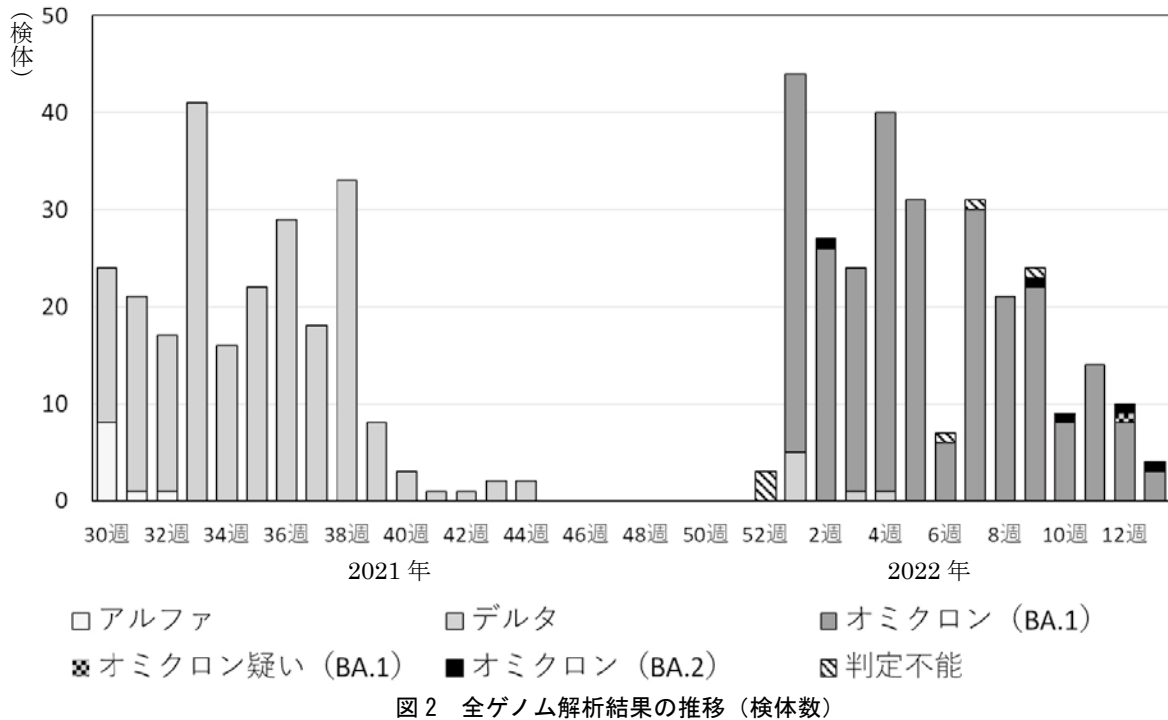


図 2 全ゲノム解析結果の推移 (検体数)

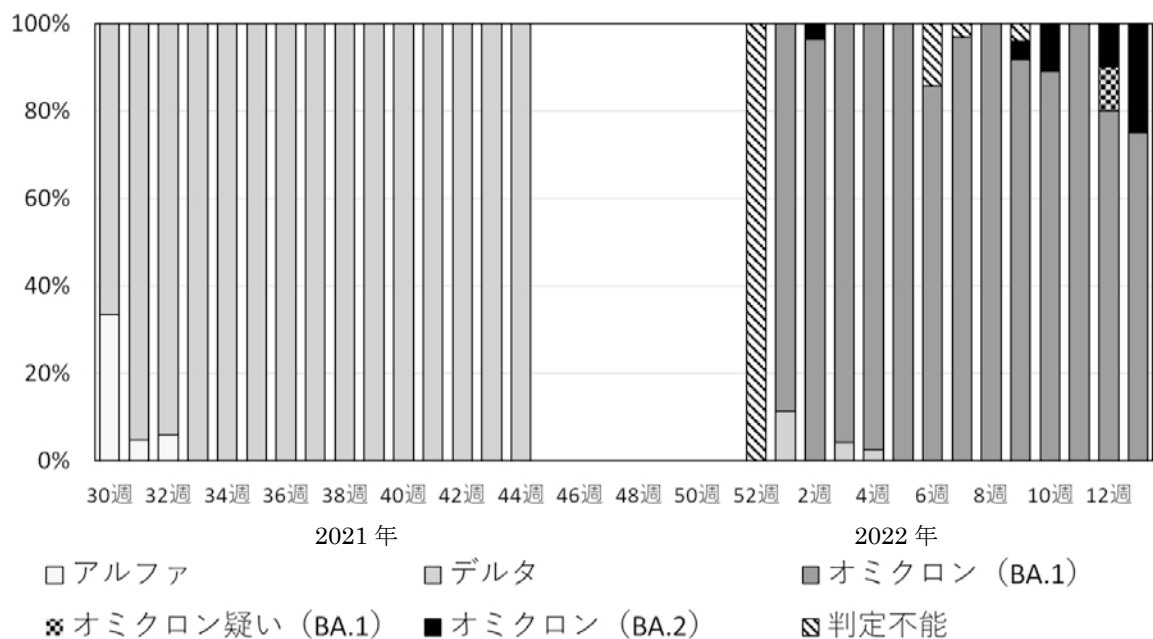


図 3 全ゲノム解析結果の推移 (検出割合)

なお、解析に使用した検体は、変異株スクリーニング検査で判明した流入監視が必要な新たな変異株疑いを優先的に解析対象に選定している。そのため、検出割合については、流入監視が必要な新たな変異株（第5期はデルタ株、第6期はオミクロン株）が過大に解析されるバイアスがかかり、当時の流行株の割合を正しく反映していない可能性を考慮する必要がある。

3. 2 ハプロタイプネットワーク図

全ゲノム配列（約 30,000 塩基）を欠損なく確定できた 449 検体のハプロタイプネットワーク図を、Pop Art version 1.7 を用いて作成した（図 4）。円と円をつなぐ直線に添えられた数字はゲノムの変異数を表し、円の大きさは同一塩基配列のウイルス株数を示す。今回の解析では、感染系統を代表する検体、もしくは既存の解析検体との関

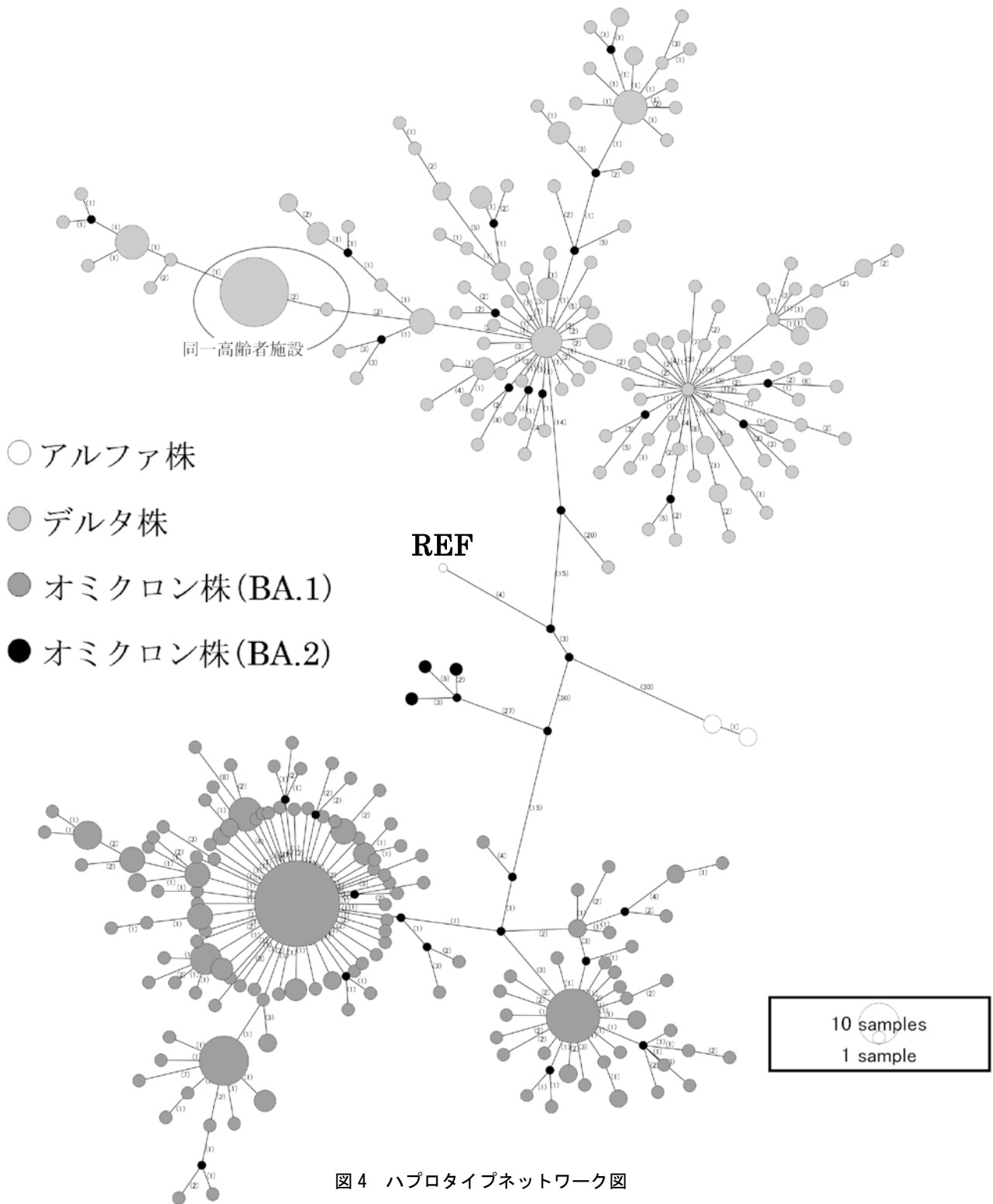


図 4 ハプロタイプネットワーク図

係性が不明な検体を選定し、解析することで多様なウイルス株を解析していると考える。

特に、感染拡大第5期のデルタ株について、同一塩基配列のウイルス株を検出する事が少なかったのは、実地疫学調査が十分に行えており、新規の流入を解析できていたためと考える。1つだけ特に大きく株数が多い円があるが、対策チームからの依頼により、新型コロナウイルスワクチン接種者のブレイクスルー感染（同一高齢者施設由来）症例を多く解析した分（図4で○で囲んだ25検体）が相当する。

一方、感染拡大第6期のオミクロン株では、同一塩基配列のウイルスを検出する機会が多く、最大で45検体から検出した。この45検体の採取期間は2022年1月6日（2022年第1週）から2022年3月14日（2022年第11週）で、多くは2022年第5週までに採取された検体であった（図5）。この期間は感染が急拡大し、全ゲノム解析用の検体選定時点には感染経路が不明だった検体の割合が高かった。また、追加疫学調査情報に基づいて判断された感染系統は40系統であった。ゲノム情報を用いた解析の際の基本的注意事項として「同一塩基配列＝同一クラスターとは限らず、別々の経路での感染拡大がたまたま重なる場合も考慮すべき」ことがしばしば念押しされるが、まさに疫学調査情報により、「別々の経路での感染拡大がたまたま重なる場合」が生じることが裏付けられた。

さらに、このウイルス株から多数のウイルス株が広がる形状のハプロタイプネットワーク図となっている。これは中心のウイルス株が感染拡大する中で、様々な箇所に変異が生じたためと考えられる。一部のウイルス株はさらに繋がりがあがるウイルス株が存在し、これらは感染の拡大を防止できなかったか、もしくは新たに近縁のウイルス株の流入があったためと考えられる。COG-JPのハプロタイプネットワーク図で全国状況を見ても、感染拡大時には同様の傾向がみられる。県内のSARS-CoV-2陽性者数に対して、実施できた全ゲノム解析数の割合は低いが、同一塩基配列を多く検出したウイルス株は福井県内での市中感染の代表的なウイルス株であった可能性が考えられる。

3.3 実地疫学調査との照合

実地疫学調査の結果とハプロタイプネットワーク図を照合し、関連が疑われる感染集団に属する解析検体を検索した。解析検体数の多かった感染集団3つとして、A：11

検体、B：9検体、C：8検体が確認できた（図6）。AとCは感染拡大第5期の感染集団でデルタ株、Bは感染拡大第6期でオミクロン株であった。

Aは、園児や小学生とその家族が中心に構成されており、居住地域が近い傾向にあった。解析に使用した検体の採取期間は約1か月半であった。ハプロタイプネットワーク図では核となるウイルス株があり、1塩基違いのウイルス株が複数確認され、ゲノム情報からも関連性が高いと考えられる。

Cは、会社員とその家族が中心に構成されている。解析に使用した検体の採取期間は約1か月であった。ハプロタイプネットワーク図ではかなり離れた位置の2グループに分別され、ゲノム情報からは関連性が低いと考えられる。

Bは、高校生や大学生とその家族が感染初期の中心に構成されている。解析に使用した検体の採取期間は約2か月であった。ハプロタイプネットワーク図では少なくとも5つのグループに分別でき、これら5グループについてゲノム情報からは関連性が低いと考えられる。

4. まとめ

当センターで福井県内の陽性検体に由来するSARS-CoV-2の全ゲノム解析を実施した。解析結果として、感染拡大第5期ではデルタ株を、感染拡大第6期ではオミクロン株を多く検出した。

感染系統を代表する検体、もしくは既存の解析検体との関係性が不明な検体を選定し解析したが、ハプロタイプネットワーク図によれば、同一塩基配列のウイルスを複数検出する傾向が、感染拡大第5期主流のデルタ株に比べ、感染拡大第6期主流のオミクロン株で強かった。感染拡大第5期までは、県外滞在歴等の実地疫学調査が十分行われ、新たな流入と考えられる検体を解析できていたと考えられる。また、感染拡大第6期においては、同一塩基配列でも疫学調査情報により別々の感染経路と思われる場合が確認でき、ゲノム情報を用いた解析には実地疫学調査が欠かせないことを痛感した。

その一方で、疫学調査情報から関連が疑われる感染集団を、全ゲノム解析の結果により分別することが可能であった。

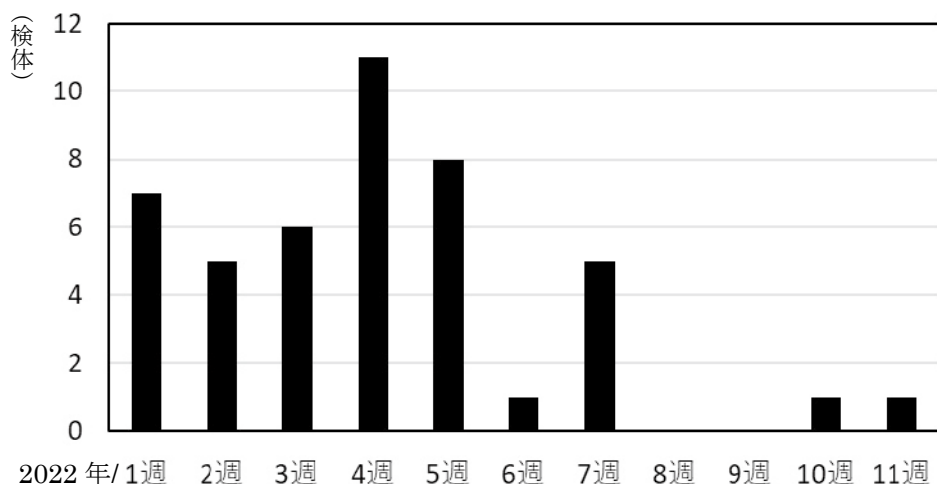


図5 同一塩基配列ウイルス株45検体の全ゲノム解析数の推移

参考文献

- 1) 国立感染症研究所：リアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS- CoV-2 Spike L452R 変異の検出
- 2) 国立感染症研究所：臨床検体を用いた評価結果が取得された 2019-nCoV 遺伝子検査方法について
- 3) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「2019-nCoV」
- 4) 国立感染症研究所：Oxford Nanopore Mk1c & NEB 社 ARTIC SARS- CoV-2 Companion Kit (ONT) 編
- 5) Jessica W. Leigh and David Bryant：Methods in Ecology and Evolution 6, 1110–1116 (2015)

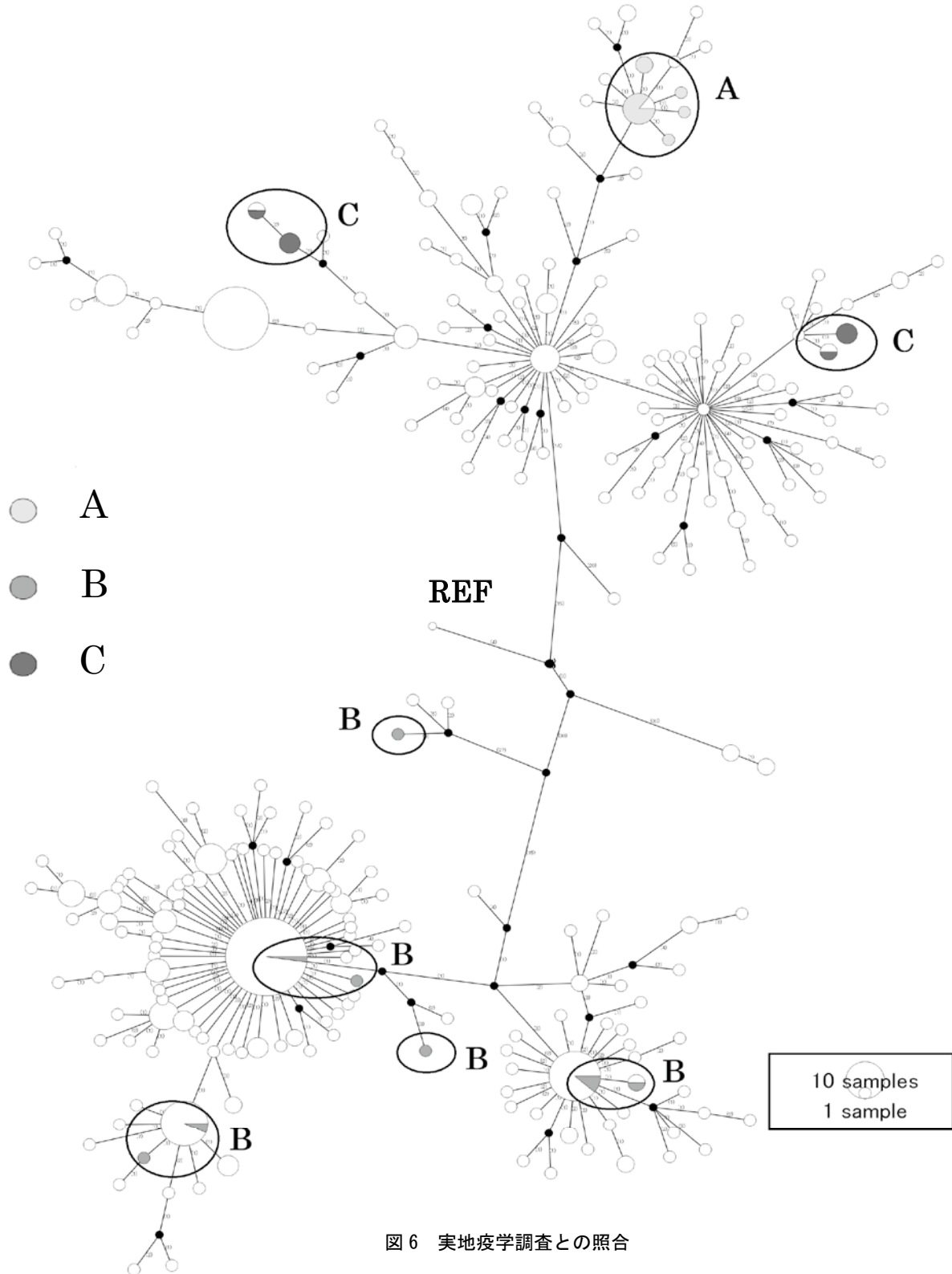


図 6 実地疫学調査との照合