

特 集

—新型コロナウイルス感染症 2019—

## 新型コロナウイルスの変異とゲノム解析

獨協医科大学 病理学講座

矢澤 華子, 石井 順, 矢澤 卓也

### はじめに

中国武漢で最初に報告された SARS-CoV-2 は、瞬く間にパンデミックを引き起こし、遺伝子変異を重ね、未だその流行は収まる兆しが無い。我々人類はこれまでに培ってきた分子生物学、免疫学、微生物学などの叡智を結集し、驚異的なスピードでワクチン、治療薬を開発しているが、SARS-CoV-2 はこの約 2 年の間に様々な変異を遂げ、あたかも意思を持ってワクチンや治療薬から回避し続けているようにも見える。この構図は、悪性腫瘍が遺伝子変異により薬剤耐性を獲得する機序に類似している。「がんは遺伝子病である」ことは今や常識となり、がんに対する治療はより副作用の少ない分子標的治療へとシフトしつつあるが、遺伝子変異解析と変異遺伝子産物の立体構造の変化を知ることが分子標的治療の発展にとって不可欠であるように、SARS-CoV-2 に対する今後の対応においても、その遺伝子変異を正確かつ速やかに検出し、全世界規模のデータベースに登録し、流行の現状を発信し続けることが重要である。

### 栃木県における全ゲノム解析の実際

我々病理学講座スタッフは、本学の関連病院であり栃木県北の医療拠点の一つである菅間記念病院において、SARS-CoV-2 の PCR 解析および全ゲノム解析を行っており、PCR 解析は 2020 年 4 月、全ゲノム解析は 2021 年 2 月にスタートしている。

SARS-CoV-2 の PCR 解析は、対象が RNA virus であるが故にリアルタイム RT-PCR での検出となる。株の簡易同定は PCR 産物を用いたサンガーシーケンス法により行っているが、特異な臨床経過をとる症例や、本邦において流行が危惧される変異株の蔓延状態を把握する必要がある場合には、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行っている。栃木県における全ゲノム解析は、当初菅間記念病院のみで行われていたが、現在では

栃木県保健環境センターでも行われるようになっていく。

次世代シーケンサーは非常に高価であり、基本的には潤沢な予算を確保できる大規模施設でなければ速やかな導入は困難である。幸いにも菅間記念病院では 2020 年末に栃木県からの助成が得られたことで、最新機種の次世代シーケンサーである ThermoFisher 社の Genexus (図 1) を導入することができた。この機種の特徴は Ion Torrent Genexus System を採用しており、シーケンス反応からゲノムデータの解析が all in one でできること、turn-around-time が最短わずか 20 時間であることである。つまり検体採取から最短 24 時間程度で遺伝子配列結果を得ることができるため、入院している患者さんにタイムラグなく適切な処置を行うことができ、医療従事者には適切な病室配置を行えるというメリットがある。

Ion Torrent Genexus System の原理について説明する。まずウイルス遺伝子の全領域をカバーするように設計されたプライマー・プールを用いて PCR を行い、



図 1 NGS 解析装置, Ion Torrent Genexus System (Thermo Fisher Scientific 社)

125~275 base の多数のアンプリコンを得る。それらにアダプターとバーコード配列を付加することでライブラリを調製し、さらに固相ビーズへと結合させることでテンプレートを調製する。このテンプレートを半導体チップ上の各ウェルに種類ずつローディングすることで、シーケンスの準備が整う。シーケンス反応では、ウェルに4種のヌクレオチドを順番に流してゆく。テンプレートに相補的なヌクレオチドが流れてきた際には、ポリメラーゼによる伸長反応が生じてヌクレオチドが取り込まれ、水素イオンが放出される。この水素イオンの有無を検出することで、どのような順番でヌクレオチドが取り込まれているかが明らかとなり、遺伝子の塩基配列が決定される。Ion Torrent Genexusを用いたSARS-CoV-2 遺伝子解析では、Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 パネルを用いることによりウイルスを単離することなくSARS-CoV-2ゲノムを解析できる。このパネルでは、ウイルスRNAのコピー数が少ない場合に低コピー用のアッセイプログラムを用いることも可能である。以下に、実際の手技と、良好な解析のための重要ポイントを示す。

まず、キットを用いて検体に含まれるウイルスRNAを抽出し、逆転写 real time PCR 法にて検体に含まれるウイルスのコピー数を算出する。得られたウイルスRNAの500~20,000コピー分をIon Torrent Genexusでの解析に供する。装置からの指示に従いRNAや試薬類をセットし、Runボタンを押すことで作業は完了する。Ion Torrent Genexus Systemは、次世代シーケンス(Next Generation Sequencing (NGS))のほとんどの工程(ライブラリ調整およびテンプレート調整、シーケンス反応、結果の解析)を自動で行うため、いかに質の高いRNAを用意できるかが良好な結果を得る上での鍵となる。そのため、場合によっては抽出したRNAの再精製や、RNA濃度測定器を用いた質の確認を行う。そもそも、ウイルスRNA量は発症した直後にピークを迎え、その後は減少に転じてゆくため、可能な限り発症からの時間を空けずに検体を採取することが望ましい。また、SARS-CoV-2はRNAウイルスであることから、NGS解析には、RNA分解酵素を多量に含む唾液よりも鼻咽頭ぬぐい液から抽出されるRNAの方が好ましい。実際に我々が他施設から依頼された唾液検体と鼻咽頭ぬぐい液検体を用いて全ゲノム解析の結果を比較したところ、唾液検体では解析不良になることが多く、特に検体輸送に日数がかかったものや、明らかにウイルスコピー数が多い検体(Ct値<20)において解析結果が不良であった。ウイルスコピー数が多い検体では断片化されたRNAが多く含まれており、抽出されたRNA検体を再

度精製して断片化RNA含有率を下げることにより良好な解析結果を得ることができた。国立感染症研究所の「2019-nCoV感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル(2020/06/02更新)」では、発症後10日日以降の唾液については、ウイルス量が減少するため推奨されないと示されており、検体輸送までの時間も48時間以上かかる場合は-80℃で凍結保存すること(すなわちRNA抽出まではできるだけ冷所保存が望ましいこと)が推奨されている。感染者の増加に伴い、各自治体や検査機関に持ち込まれる検体数は増加の一途を辿っているが、その影響で検体の保存状態およびRNA抽出までの時間が各施設によって異なる可能性も否定できない。唾液検体を用いる場合は特に、検体を採取してからRNAを抽出するまでの保存期間(24時間を超えない)と保存状態(冷所保存)が、全ゲノム解析の解析結果に大きく影響する。このように全ゲノム解析において良好な解析結果を得るためには、検体採取のタイミングとその方法に大きく左右されることを強調しておきたい。

解析の後に得られたデータは、付属のサーバーとSARS-CoV-2専用の解析プラグインにより解析され、得られたSARS-CoV-2のコンセンサス配列や検出された変異・遺伝子名・アミノ酸置換などがリスト化され自動的に出力される。このようにIon AmpliSeq SARS-CoV-2パネルでは、NGS解析により得られた塩基配列データから様々な解析ツールを用いて改めて情報解析を行う従来の方法に比べ、解析にかかる莫大な労力と時間が短縮できるのが利点の一つであろう。

## GISAID と HGC-SARS-CoV-2 Variant Browser

全ゲノム解析により得られた遺伝子情報は、GISAID(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)に登録される(図2)。GISAIDは2008年に設立された世界的な科学イニシアチブであり、ドイツ、ミュンヘンに本部を置き、インフルエンザウイルスとSARS-CoV-2のゲノムデータへのオープンアクセスを提供している。2021年9月4日現在で、SARS-CoV-2のゲノムに関するデータは約330万件が登録されており、これらのゲノム情報は、東京大学医科学研究所と日本IBM(株)が、SARS-CoV-2の変異状況のモニタリングならびにウイルス感染経路の同定に活用するため開発した、HGC-SARS-CoV-2 Variant Browser(図3)によってSARS-CoV-2の流行経路の解析や、ワクチン、治療薬の開発に役立てられている。

GISAIDへのデータ登録は、得られたSARS-CoV-2の塩基配列データファイル(FASTA形式)を用いて電

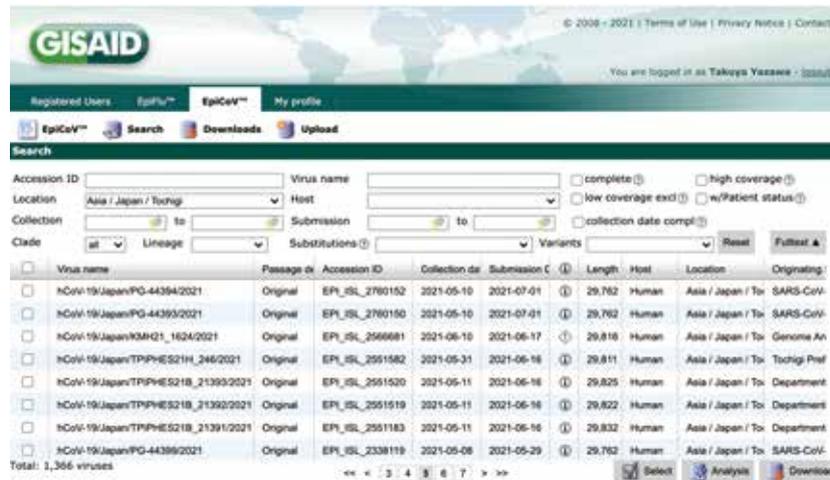


図2 GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, <https://www.gisaid.org/>) 検索画面。

これまで栃木県で確認された変異株の全ゲノム情報は GISAID に登録済である。

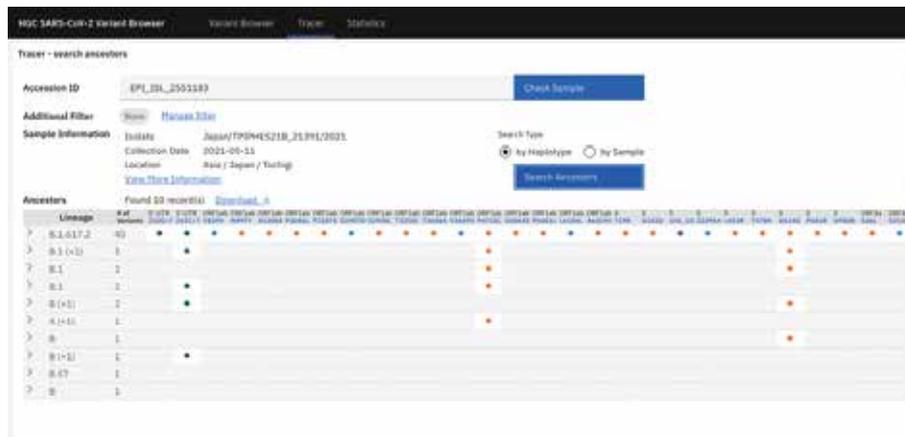


図3 HGC-SARS-CoV-2 Variant Browser による栃木県患者の感染経路の検索

的に申請することにより行われ、GISAID 側でキュレーターによる配列の検証が行われる。検証により信頼性を確認されたゲノムデータは、リアルタイムで登録される。図4に実際の登録情報を示す。GISAID 画面上には、登録した SARS-CoV-2 がどの系統 (Clade や Linage) に属し、どのような遺伝子変異が存在するのかについて、分かりやすくまとめられている。

これまで我々が解析した全ゲノム解析結果については、本号の「県北民間病院における COVID-19 の診療」(丹内, 菅間) を参照して頂きたい。

### SARS-CoV-2 全ゲノム解析の重要性

SARS-CoV-2 は RNA polymerase に加えて、校正機能を司る exonuclease を有しているため、インフルエンザウイルスなど他の RNA ウイルスに比較するとゲノム複製ミスの頻度は低い。しかし Korber らがスパイク

(S) タンパクをコードする 614 番目のアミノ酸がアスパラギンからグリシンに置換されている (D614G) 株が驚くべきペースで増加していることを報告して以来<sup>1)</sup>、特に S タンパク領域の遺伝子変異に起因するアミノ酸置換と感染性、重症度、再感染性やワクチンに対する効果の関連性が注視されるようになってきている。これまで 2020 年 9 月に英国で最初に検出されたアルファ株 (B.1.1.7 系統) では N501Y が、2020 年 5 月に南アフリカで最初に検出されたベータ株 (B.1.351 系統) や 2020 年 11 月にブラジルで最初に検出されたガンマ株 (P.1 系統) では N501Y に加え E484K が、そして 2020 年 10 月にインドで最初に検出されたデルタ株 (B.1.617.2 系統) では L452R が、少なくとも感染性に影響を及ぼしているとされている。我々も本年 3 月に E484K 単独変異株が栃木県で流行していることを報告してきたが、8 月になり我が国及び栃木県で流行している株がほぼデル

<b>Virus name:</b>	hCoV-19/Japan/TPHPHES21B_21193/2021
<b>Accession ID:</b>	EPI_ISL_2561520
<b>Type:</b>	betacoronavirus
<b>Clade:</b>	O
<b>Pango Lineage:</b>	B.1.617.2 (Pango v.3.1.9 2021-07-28), Delta (B.1.617.2-ike) (Scorpio)
<b>AA Substitutions:</b>	Spike D614G, Spike D950N, Spike E156G, Spike F1570H, Spike G142D, Spike L452R, Spike P681R, Spike R158del, Spike T19R, Spike T478K, M162T, N D63G, N D377Y, N G215C, N P13T, N R203M, NS3 S26L, NS7a T120I, NS7a V62A, NS7b T40I, NSP3A488S, NSP3 N119Y, NSP3 P1228L, NSP3 P1469S, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 T77A, NSP12 G671S, NSP12 P323L, NSP13 P77L, NSP14 A394V
<b>Variant:</b>	VOC Delta G/478K.V1 (B.1.617.2+AY.1+AY.2+AY.3) first detected in India
<b>Passage details/history:</b>	Original
<b>Sample information</b>	
<b>Collection date:</b>	2021-05-11
<b>Location:</b>	Asia / Japan / Tochigi
<b>Host:</b>	Human
<b>Additional location information:</b>	
<b>Gender:</b>	Female
<b>Patient age:</b>	28
<b>Patient status:</b>	unknown
<b>Specimen source:</b>	
<b>Additional host information:</b>	
<b>Sampling strategy:</b>	
<b>Outbreak:</b>	
<b>Last vaccinated:</b>	
<b>Treatment:</b>	
<b>Sequencing technology:</b>	Ion Torrent Genexus
<b>Assembly method:</b>	IRMA
<b>Coverage:</b>	
<b>Comment:</b>	① Gap of 12 nucleotides when compared to the reference sequence.

図4 GISAIDに登録された変異株(デルタ株)の情報画面  
Clade, Pango Lineageとともに、詳細な変異情報が記載されている。

タ株に置き換わっているという事実は、デルタ株の感染性が極めて高いことを示唆している。本稿を執筆している9月現在、イータ株、イオタ株、カッパ株、ミュー株など新たな変異株も出現し、既に日本国内でも確認されているものもあることから、SARS-CoV-2の制御のためには、今後もゲノム解析を継続し、解析数を増やしていくことが重要であると思われる。

### おわりに

新型コロナウイルスの変異とゲノム解析の現状について論じた。できるだけ早期に未曾有のパンデミックを取束させ、犠牲者を減らし、日常を取り戻すことは、我々全人類の悲願である。しかし現状において、SARS-CoV-2のゲノム解析にはハード面、人的資源、いずれにおいても未だ多くの制約と問題点が存在している。一

刻も早く、官民学が一体となってゲノム解析システムを栃木県内、国内、そして世界中に構築することが望まれる。また感染者に対して最適な医療を提供しその命を救うことは、我々医療人の責務であることは言うまでもない。しかし感染症対策の原点である「可能な限り感染を蔓延させないこと」、このことこそが新たな変異株を作らせないことに直結する。我々医療関係者は、今後も感染回避のための啓発を、根気強く行い続けていくべきである。

### 参考文献

- 1) Korber B, Fisher WM, Gnanakaran S, et al : Tracking changes in SARS-CoV-2 spike : evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* **182** : 812-827, 2020.