

ノート

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)

Surveillance of Viruses with Amino Acid Mutation (D614G) in the Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) -Mie Prefecture, Japan- (January 2020 - September 2020)

矢野 拓弥, 永井 佑樹, 楠原 一, 小林 章人, 大市 真梨乃, 竹内 浩,
渡部 ひとみ, 西 智広, 林崎 由美子, 森 康則, 吉村 英基, 北浦 伸浩,
中井 康博

Takuya YANO, Yuhki NAGAI, Hajime KUSUHARA, Akihito KOBAYASHI, Marino OICHI,
Hiroshi TAKEUCHI, Hitomi WATABE, Tomohiro NISHI, Yumiko HAYASHIZAKI,
Yasunori MORI, Hideki YOSHIMURA, Nobuhiro KITAURA and Yasuhiro NAKAI

本県で検出されたSARS-CoV-2におけるSpike遺伝子のアミノ酸遺伝子 (614位) がアスパラギン酸 (D) からグリシン (G) への置換 (D614G変異) を有するウイルスの動向を調査した。またReal time RT-PCR法により得られたCt (Threshold Cycle) 値を指標としたウイルス量 (感染力) と病日の相関性を調べ、D614G変異との感染力との関連性について検証した。

SARS-Cov-2陽性患者のSpike遺伝子のD614G変異の解析結果は、30名中26名 (86.7%) がD614G変異を保有していたが、2020年3月上旬以前の患者からは、当該アミノ酸変異は確認されておらず、一方で2020年3月下旬以降の患者から検出されたウイルスは、全てD614G変異を保有していた。このことは県内において、D614G変異を有しない中国由来のウイルスが2020年1~3月上旬に流行し、同年3月下旬以後はD614G変異を保有する欧州由来のウイルスによる流行に移行したものと推察された。2020年3月上旬以前に患者から検出されたウイルスは、Ct値からウイルス量が少なく、3月下旬以後の患者は比較的ウイルス量が多い傾向であったことは、D614G変異との関連性が推察される結果であった。また陽性検体中のウイルス量は発症後の時間経過に伴い、Ct値は大きくなり、すなわちウイルス量の低下がみられ、病日とCt値には正の相関を示す可能性が示唆された。

キーワード：新型コロナウイルス, SARS-CoV-2, アミノ酸変異 (D614G), Ct (Threshold Cycle) 値

はじめに

ヒトにおいて主に流行しているヒトコロナウイルス (Human Coronavirus: HCoV) は、一般的には鼻風邪を主とする呼吸器症状を呈する急性呼吸器感染症で、229E, NL63, OC43 および HKU1 の 4 種^{1,2)} が知られている。当研究所においても県内で発生した集団感染事例³⁾ や 2013 年に OC43 の地域流行^{4,6)} を捉えてきた。

さらには、ヒトコロナウイルス感染が社会的に大きく注目された事例としては重篤な肺炎

を引き起こし 2003 年に流行した SARS コロナウイルス (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)^{7,8)} や中東諸国を中心に散発的に感染者がみられ、2015 年に韓国で院内感染を引き起こした MERS コロナウイルス (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) が挙げられる^{9,10)}。

そして 2020 年には Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) が出現

表 1 SARS-CoV-2 Spike遺伝子検出用のプライマー

	プライマー名称	配列 (5'-3')
Forward primer	SARS-Cov-2: Spike-F	TTCTTACTGAGTCTAACAAAA
Reverse primer	SARS-Cov-2: Spike-R	GTTATTAGAGTAAGCAACTG

し、同年1月以降に中国湖北省武漢市での感染拡大や日本国内における患者発生および武漢への渡航歴の無い患者からのヒトからヒトへの感染事例が報告された¹¹⁻¹³⁾。三重県内においても2020年1月下旬には、武漢市に滞在歴のあった患者(国内10例目)¹⁴⁾より同ウイルスが検出され、以後、世界的な流行に至った¹⁵⁻¹⁸⁾。

SARS-CoV-2は発生から数か月経過し、病原性や流行状況および遺伝子変異等が明らかになりつつあるが、依然として不明な点が多いウイルスである。そこで、我々はSARS-CoV-2のSpike遺伝子におけるアミノ酸遺伝子(614位)がアスパラギン酸(D)からグリシン(G)への置換が生じると抗体との反応性やウイルス量(感染力)との関連性が示唆^{19, 20)}されていることに着目した。本県で検出されたSARS-CoV-2においてアミノ酸変異(以下D614G変異)を有するウイルスの動向とReal time RT-PCR法により得られたCt(Threshold Cycle)値を指標としたウイルス量と病日の相関性を調べ、さらにD614G変異を有するSARS-CoV-2とウイルス量との関連の有無について検証を行ったので報告する。

対象と方法

1. 調査対象

2020年1月～2020年9月に新型コロナウイルス行政検査あるいは三重県感染症発生動向調査事業において、県内の医療機関を受診した呼吸器症状等を呈し、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)を対象とした。陽性者のうち、無作為に選定した30名について、再度RNA抽出を行いSARS-CoV-2におけるSpike遺伝子について、D614G変異の有無を解析した。

Ct値と病日との相関性は、2020年1月～2020年9月に検出されたSARS-CoV-2陽性者126名を対象とした。

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 Spike遺伝子のD614G変異解析

臨床検体からのウイルスRNA抽出には、QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を用いた。One-Step RT-PCR法にはSuperScript One-Step RT-PCR System for Long Templates(Thermo Fisher Scientific)を使用した。

RT-PCR法には、当所で設計したプライマー(表1)を使用した。50℃(30分間)の逆転写反応(RT反応)後、94℃(2分)の熱変性により二本鎖DNAを一本鎖にし、以下、94℃(15秒)、50℃(30秒)、68℃(2分)のPCR増幅反応(40サイクル)を行った。PCR増幅反応後、電気泳動にて増幅産物(498bp)の有無を確認した。得られたPCR増幅産物はQIAquick PCR purification kit(Qiagen)で精製を行い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いたダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。

3. Real time RT-PCR法による病日とCt値の相関性

Real time RT-PCR法によるSARS-CoV-2の検出は国立感染症研究所の新型コロナウイルス感染症検査マニュアル記載のN2プライマー・プローブセットを用いた。Real time RT-PCR法には、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を使用した。反応条件は、50℃(5分間)のRT反応後、95℃(20秒)での逆転写酵素の不活化を実施し、以下、95℃(15秒)、60℃(1分)のPCR増幅反応(45サイクル)を行った。

なお、本研究では、Qiagen社のReal time RT-PCR試薬を使用した。一部、Thermo Fisher Scientific社のReal time RT-PCR試薬、タカラバイオ社のダイレクトPCR試薬を使用し検査を実施した。検討条件を揃えるため、異なる試薬を用いたものについてはThermo Fisher Scientific社のReal time RT-PCR試薬で、再度Ct値を測定し検証に用いた。

表2 SARS-CoV-2 Spike遺伝子のアミノ酸変異 (D 614 D/G)

	発症日	発症日		採取月日		D 614 D/G
		月	日	月	日	アミノ酸置換
1	27	1	25	1	29	D 614 D
2	227	3	11	3	11	D 614 D
3	228	3	11	3	11	D 614 D
4	229	3	11	3	11	D 614 D
5	473	3	29	3	29	D 614 G
6	510	3	30	4	31	D 614 G
7	802	4	4	4	7	D 614 G
8	803	4	3	4	7	D 614 G
9	884	4	8	4	9	D 614 G
10	889	4	3	4	10	D 614 G
11	1029	4	5	4	15	D 614 G
12	1053	4	9	4	15	D 614 G
13	1057	4	7	4	15	D 614 G
14	1204	4	12	4	17	D 614 G
15	1324	4	13	4	19	D 614 G
16	1593	4	12	4	24	D 614 G
17	2232	7	5	7	8	D 614 G
18	2333	7	13	7	14	D 614 G
19	2338	7	10	7	14	D 614 G
20	2465	7	20	7	21	D 614 G
21	2586	7	23	7	24	D 614 G
22	2644	7	21	7	25	D 614 G
23	2720	7	26	7	26	D 614 G
24	3294	7	31	7	31	D 614 G
25	3396	7	29	7	31	D 614 G
26	3628	8	1	8	3	D 614 G
27	3822	8	2	8	4	D 614 G
28	3835	8	1	8	4	D 614 G
29	6890	9	2	9	2	D 614 G
30	7304	9	9	9	9	D 614 G

※SARS-CoV-2は 2020年2月と5月は未検出, 6月は再陽性事例のみであった。

結果

1. SARS-Cov-2 Spike遺伝子のD614G変異解析

2020年1月～2020年9月に検出されたSARS-Cov-2陽性者のうち30名についてSpike遺伝子におけるD614G変異の有無を解析し, その結果を表2に示した。

SARS-Cov-2が検出された30名中26名(86.7%)は, D614G変異を保有していた。これらのSARS-Cov-2陽性者の検体採取時期が, 2020年3月11日以前の場合, D614G変異を有するウイルスは認められなかった。一方で, 2020年3月29日以降の患者から検出されたウイルスは, 全てD614G変異を保有していた。

2. SARS-Cov-2陽性者の病日とCt値の相関性

調査期間中に検出されたSARS-Cov-2陽性者126名におけるCt値を算出し, 病日とCt値の相関を図1に示した。各病日のCt値の最小二乗法による線形近似式は $y=0.7977x+22.809$, 相関係数は0.40を示し, 各病日とCt値には正の相関を示す可能性が示唆された。

Ct値(≥30)を超える陽性者は126例中35例(27.7%)であったが, 前述のD614G変異の保有状況より, 本変異を有しない2020年3月11日以前に検出された7例のSARS-Cov-2の病日(Ct値)は, 第0病日(25.6, 32.1, 34.8, 36.0, 37.9), 第4病日(26.5), 第7病日(35.0)であった。

各病日のCt値(平均)を図1に示した。各病日とCt値の平均値により相関係数を求めたところ0.67で, Ct値(平均)においても各病日と正の相関がみられた。7例のSARS-Cov-2陽性者(第0, 4, 7

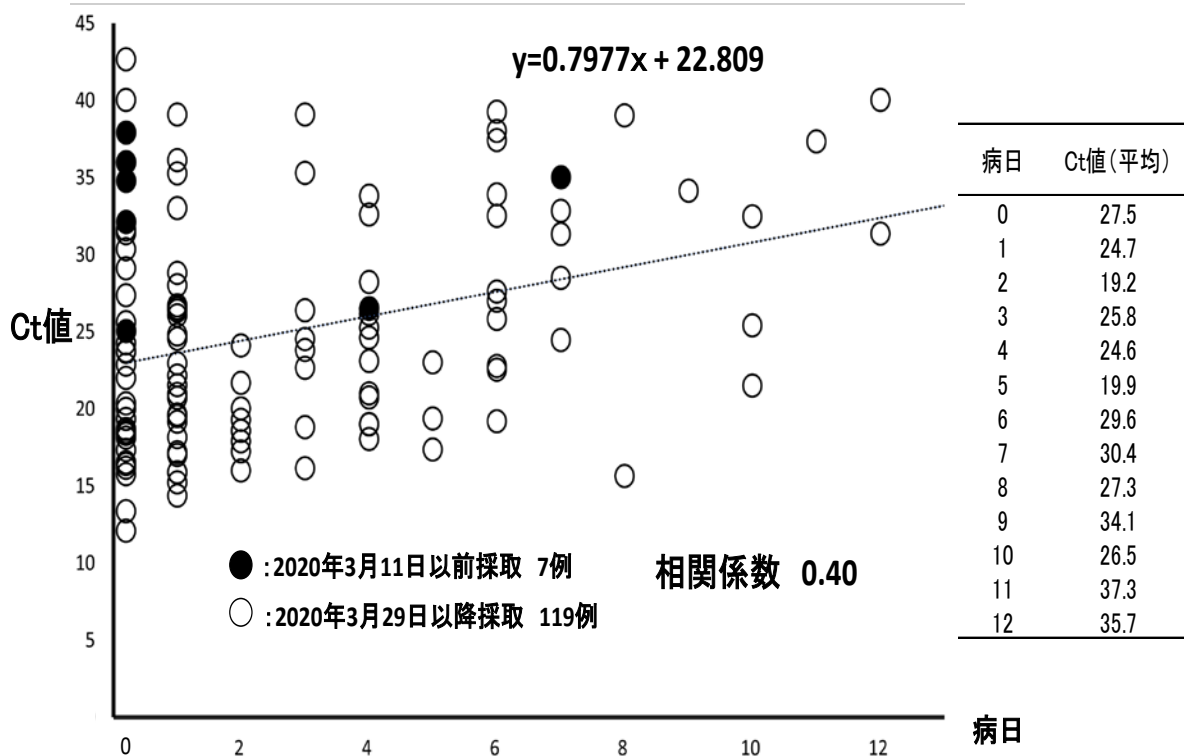


図1 病日とCt値の相関(n = 126)

病日)が属する病日におけるCt値(平均)は、第0病日(27.5)、第4病日(24.6)、第7病日(30.4)であり、第0病日の1例を除いて、他はCt値(平均)と比較し、平均値を超えるCt値を示していた。これらのうちCt値30を超える陽性例は7例中5例(71.4%)であった。一方でD614G変異を有していた2020年3月29日以降に検出された陽性例でのCt値30以上は、119例中30例(25.2%)であった。

考察

我々は、本県で検出されたSARS-CoV-2においてD614G変異を有するウイルスの動向を調べた。また、感染性ウイルスの存在を証明するものではないが、低いCt値は高ウイルス量を示唆し、Ct値は感染性に関連する可能性が示唆されている²¹⁾。米国CDCの報告ではCt値(33~35)ではウイルス分離が多くの場合で困難²²⁾であったことから、Real time RT-PCR法により得られたCt値を指標としたウイルス量と病日の相関性を比較し、ウイルス量からD614G変異との感染力との関連性について検証を行った。

SARS-Cov-2は、初期の中国での流行ウイルス株とその後、欧州を中心に流行した株とは異なるタイプであったことが報告されている²³⁾。国内での流行状況は、国立感染症研究所におけるSARS-Cov-2のゲノム分子疫学調査²⁴⁾によると、本ウイルスは2020年3月初旬から欧州や北米での

感染拡大に伴い、同年3月下旬から4月以降の国内での流行ウイルスは欧州由来株であった事が判明している。調査期間中にSARS-Cov-2陽性患者のSpike遺伝子のD614G変異の解析結果は30名中26名(86.7%)がD614G変異を保有していたが、武漢由来のウイルスであることが推察される2020年3月11日以前の患者からは、当該アミノ酸変異は確認されておらず、一方で2020年3月29日以降の患者から検出されたウイルスは、全てD614G変異を保有していた。このことは県内において、3月下旬以後はD614G変異を保有する欧州由来のウイルスによる流行に移行していたものと考えられる。ウイルスの構造に重要なSpike遺伝子には十数カ所の変異が認められており、そのうちD614G変異を有するウイルス株は2020年2月初旬以降に欧州から全世界に拡散した。この変異ウイルスの感染患者は、変異を持たないウイルスに感染した患者より検体に含まれるウイルス量が多い事が報告²⁰⁾されていることより、SARS-CoV-2はSpike遺伝子のD614G変異と感染力等との関連性が示唆¹⁹⁾されている。今回の検証で、陽性検体中のウイルス量は発症後の時間経過に伴い、Ct値は大きくなった。すなわちウイルス量の低下がみられ、病日とCt値には正の相関が認められており、武漢由来のウイルスとみられる2020年3月上旬までに採取されたCt値30を超える陽性例は71.4%であった。一方で欧州由来とされる2020年3月下旬以降に採取さ

れた陽性例でのCt値30以上は25.2%で、同年3月後半以降の陽性者のCt値は低く、ウイルス量が多い傾向がみられた。Ct値が低いほど、高濃度のウイルスであるため、感染力に少なからず関与することが考えられた。

県内ではD614G変異を保有するウイルスは、2020年3月下旬以後は優勢となったが、それ以前に県内で検出されたウイルス数が少なく検討した母集団が少数であった。このため今回の検証においては、結論付には限界があるが、患者検体から検出されたD614G変異を有するウイルスは、Ct値からウイルス量が高濃度である傾向がみられたことは、感染力との関わりが既報¹⁹⁾と同様に推察されるものと思われた。

当所では次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer ; NGS) を保有していないため、断片的な遺伝子の解析に留まっているが、今後は、NGS ゲノム解析による積極的疫学調査と、その解析結果の活用が本県の公衆衛生の向上のため望ましいと考える。

謝 辞

新型コロナウイルス感染症に対する積極的疫学調査および感染症発生動向調査事業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) 松本一郎, 高橋清美, 山高毅久: ウイルス検査各論 コロナウイルス. 臨床検査MOOK ウイルスの臨床検査, **28**, 120-124(1988).
- 2) Susanna K. P. Lau, Paul Lee, Alan K. L. Tsang, Cyril C. Y. Yip, Herman Tse, Rodney A. Lee, Lok-Yee So, et al : Molecular Epidemiology of Human Coronavirus OC43 Reveals Evolution of Different Genotypes over Time and Recent Emergence of a Novel Genotype due to Natural Recombination, *J Virol*, **85**, 11325-11337(2011).
- 3) 櫻井悠郎, 矢野拓弥, 福田美和 他: 三重県におけるコロナ様ウイルスによる急性胃腸炎の流行, 病原微生物検出情報, **19**, 253-254(1998).
- 4) 矢野拓弥, 前田千恵, 小林章人 他: 呼吸器症状を呈した小児から検出されたHuman coronavirus (2013年1~4月)-三重県, 病原微生物検出情報, **34**, 170-172 (2013).
- 5) 矢野拓弥, 赤地重宏: 三重県における呼吸器症状を呈した患者からのヒトコロナウイルスの動向(2014~2016年), 三重保環研年報, 第**19**号(通巻第62号), 41-44(2017).
- 6) 矢野拓弥, 落合 仁, 庵原俊昭: 三重県におけ

る急性呼吸器症状を呈した小児から検出されたコロナウイルス(HCoV-OC43)感染症誌, **88**, 708-710(2014).

- 7) 佐多徹太郎, 永田典代: 重症急性呼吸器症候群(SARS), 診断病理, **20**(3), 197-204 (2003).
- 8) 川名明彦, 照屋勝治, 山下望: 重症急性呼吸器症候群(SARS ; Severe Acute Respiratory Syndrome)に関する知見, 感染症誌, **77**, 303-309(2003).
- 9) 国立感染症研究所: 中東呼吸器症候群(MERS), 2015年11月現在, 病原微生物検出情報, **36**, 231-232(2015).
- 10) 松山州徳, 竹田誠: 中東呼吸器症候群(MERS) コロナウイルス感染症, *Medical Technology*, **41**, 1282-1285(2013).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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
1 (2020.10.06 access)
- 15) Holshue M. L, DeBolt C, Lindquist S, et al : First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States, *N. Engl. J. Med*, **382**, 929-936 (2020).
- 16) Florian Götzinger, Begoña Santiago-García, Antoni Noguera-Julián, et al : COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study, *Lancet Child Adolesc Health*, **4**(9):653-661 (2020).
- 17) WHO : Coronavirus disease (COVID-19) pandemic,
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (2020.10.06 access)
- 18) 国立感染症研究所: 海外におけるCOVID-19の流行状況について (2020年6月4日時点) 病原微生物検出情報, **41**, 105-106(2020).
- 19) Takahiko Koyama, Dilhan Weeraratne, Jane L. Snowdon et al., Emergence of Drift Variants That May Affect COVID-19 Vaccine Development and Antibody Treatment. *Pathogens* **9**(5), 324(2020).
- 20) Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S et al : Spike mutation pipeline reveals the emergence of

- a more transmissible form of SARS-CoV-2, bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.069054>(2020) . (2020.10.06 access)
- 21) Nathan W. Furukawa, John T. Brooks, Jeremy Sobel : Evidence Supporting Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 While Presymptomatic or Asymptomatic, *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul; **26**(7): e201595. doi: 10.3201/eid2607.201595 (2020) .
- 22) Centers for Disease Control and Prevention, Symptom-Based Strategy to Discontinue Isolation for Persons with COVID-19, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/strategy-discontinue-isolation.html>. (2020.10.06 access)
- 23) Peter Forster, Lucy Forster, Colin Renfrew, et al : Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes, *Proc Natl Acad Sci US A* .**28**;117(17):9241-9243.doi:10.1073/pnas.2004999117 (2020).
- 24) 国立感染症研究所：新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のゲノム分子疫学調査 2 (2020).
https://www.niid.go.jp/niid/images/research_info/genome-2020_SARS-CoV-MolecularEpidemiology_2.pdf (2020.10.06 access)