原　著

SARS-CoV-2 ゲノム配列に基づく分子疫学的動向とその特徴に関する考察（2020 年 3～10 月）

[1] 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター，[2] 名古屋大学大学院医学系研究科
中田　佳宏[1)2)]　大出　裕高[1)]　久保田　舞[1)]　松岡　和弘[1)]
松田　昌和[1)]　中筋　美穂[1)]　森　美喜子[1)2)]　今橋　真弓[1)]
横幕　能行[1)]　岩谷　靖雅[1)2)]

（令和 2 年 11 月 17 日受付）
（令和 2 年 12 月 16 日受理）

Key words：COVID-19（Coronavirus Disease 2019），
SARS-CoV-2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2），full genome, transmission

要　旨

全世界的に感染拡大している SARS-CoV-2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2）は，他の RNA ウイルスに比べて変異出現頻度は低く，そのウイルスゲノムは変化しづらいと考えられていた．しかし，昨今の急速な人から人への感染拡大により，SARS-CoV-2 ゲノムが変化しつつある．本邦では，2020 年 4 月までに clade L および S，G，GR に分類されるウイルスが海外から流入し伝播したことが報告されている．しかし，それ以降のウイルス遺伝子配列情報は乏しく，国内の分子疫学的動向は明らかになっていない．そこで，本研究では，国内の分子疫学的な動向を把握し，その特徴を明らかにするため，当院の SARS-CoV-2 陽性症例の検体（n=55）を用いてウイルスゲノム配列を決定した．さらに，既報のウイルスゲノム配列との比較解析を行った．その結果，国内の第 1 感染ピーク期ではウイルスの遺伝子型が clade S と L から clade G と GR に移行し，各遺伝子型が分散していた．一方，第 2 感染ピーク期以降では，海外では認められない国内独自の遺伝子型として集約していた．こうしたウイルス遺伝子型に集約した時期は本邦における渡航制限があった時期と相関していた．全世界的にも SARS-CoV-2 の遺伝学的多様性は地域差をもち変化しつつある．これから導入されるであろうワクチンや治療薬を有効に活用するためにも，SARS-CoV-2 の遺伝的多様性を抑える従来の感染予防対策と，より多くの地域における分子疫学的調査は必要不可欠であると考えられる．

〔感染症誌　95：293～300，2021〕

序　文

2019 年 12 月に中国武漢で端を発した severe acute respiratory syndrome coronavirus 2（SARS-CoV-2）いわゆる新型コロナウイルスによる感染症（COVID-19：coronavirus diseases 2019）[1)]は，2020 年，瞬く間に全世界に拡大した．本邦では，欧米とは異なり急激な感染拡大は阻止されてはいるものの，予断を許さない状況にある．感染対策は世界各国における独自の方策が講じられており，本邦では 2020 年 4 月 3 日より入国制限が大幅に拡大されたことに加えて，同月 7 日から首都圏をはじめとする一部の地域から始まった緊急事態措置は同 16 日より全国に拡げられた．その結果，国内における新規感染者数は 4 月下旬を境に一旦低下したものの，緊急事態宣言が解除された 5 月 25 日以降再び緩やかに増加し，7 月から 8 月にかけて 2 度目の感染者数増加のピークを迎えた．その後，10 月時点では収束の目途が立たないままに至っている．

SARS-CoV-2 はベータコロナウイルスに分類される（＋）鎖一本鎖 RNA ウイルスで，ゲノム長は約 30,000 塩基に及ぶ．コロナウイルスは，RNA ウイルスの中

責任著者：（〒460-0001）愛知県名古屋市中区三の丸 4 丁目 1-1
独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター感染・免疫研究部　岩谷　靖雅
E-mail：iwatani.yasumasa.cp@mail.hosp.go.jp

令和 3 年 5 月20日

でも大きなゲノム長を有するにも関わらず，他の RNA ウイルスと比較してゲノムの変異率が低い[2]．一般に，ゲノム長が大きい RNA ウイルスは exoribonuclease（ExoN）などをコードし，その校正機能によってウイルス複製の精度を向上させており[3]，SARS-CoV-2 の場合には Nsp14（non-structural protein 14）が ExoN として働く．ウイルスの感染サイクル当たりの変異率は低いものの全世界的に急速な感染伝播が繰り拡げられ，結果として変異が徐々に蓄積し，SARS-CoV-2 ゲノムが変化しつつある[4]．現在，遺伝系統学的な特徴から，SARS-CoV-2 は，clade L および S，V，G，GH，GR，GV，O に分類されている[5]．日本国内では，4 月までに clade L と S（武漢関連型），引き続き clade G と GR（ヨーロッパ型）の SARS-CoV-2 が海外から流入し，伝播していたことが報告されている[6]．しかし，5 月以降，特に第 2 感染ピーク以降のウイルスゲノム配列に関する情報は乏しい．そこで，本研究では日本における SARS-CoV-2 ゲノム配列解析に基づく分子疫学的動向と特徴を明らかにするため，2020 年 3 月から 10 月の間，当院を受診した SARS-CoV-2 陽性症例の検体中ウイルスの全ゲノム塩基配列を決定し，既報のウイルスゲノム配列との比較解析を行った．

対象検体と方法

1. 日本国内，愛知県及び名古屋市における SARS-CoV-2 新規感染者数推移

SARS-CoV-2 の流行状況把握のための新規陽性者発生情報（2020 年 2 月 1 日から同年 10 月 31 日）は，

厚生労働省新型コロナウイルス感染症に関する報道発表資料（https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00086.html），愛知県新型コロナウイルス感染症対策サイト（https://www.pref.aichi.jp/site/covid19-aichi/），及び名古屋市内の新型コロナウイルス発生状況（https://www.city.nagoya.jp/kenkofukushi/page/0000126920.html）より抽出した．

2. SARS-CoV-2 陽性症例検体からの RNA 抽出とウイルスゲノム配列決定

2020 年 3 月以降に当院で PCR 検査により SARS-CoV-2 陽性と判明し国内で感染した症例のうち，ウイルス量が高い（Ct＜29）軽度あるいは中度の有症状患者症例検体を対象とした．研究は，当院の研究倫理審査委員会の承認（研究番号：2020-059）のもと実施された．なお，ウイルス量が高い検体を用いた理由は，培養細胞系などによるウイルス増幅に伴う不測の変異導入[7)8)]を避け，検体から直接 RNA を抽出し効率よく次世代シーケンス（NGS：Next generation sequencing）で解析するためである．ウイルス RNA は，鼻咽頭ぬぐい液あるいは喀痰の残余検体から，国立感染症研究所の病原体検出マニュアル 2019-nCoV（https://www.niid.go.jp/）に従い QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN 社）を用いて抽出した．QIAseq SARS-CoV-2 Primer Panel（QIAGEN 社）及び QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN 社）により，NGS 用ライブラリを調製した．得られたライブラリから MiSeq Reagent Kit v3 と Illumina MiSeq（Illumina 社）を用いて配列を決定した．

3. SARS-CoV-2 ゲノム配列の解析

ウイルスのコンセンサス塩基配列は，次の手順で取得した．まず NGS で得られたリード配列から ARTIC Network V3 プライマー配列（https://artic.network/ncov-2019）を cutPrimers プログラム[9)]により除去した．BWA プログラム[10)]を使用し，SARS-CoV-2 参照配列（GenBank ID：NC_045512.2）にリード配列をマッピングし，SAMTOOLS プログラム[11)]で Mapping Quality≧60 のリード配列のみ選別した．さらに，筆者らが独自に開発した *in house* プログラム[12)]を用いてエラー補正を行った．＞20% の頻度で複数の塩基が確認された場合は縮重塩基としてコンセンサス配列を決定した．コンセンサス配列の中で coverage 数が 5 未満の領域については，ARTIC Network V3 プライマーセットを用いて Sanger 法により逐次配列を確認した．

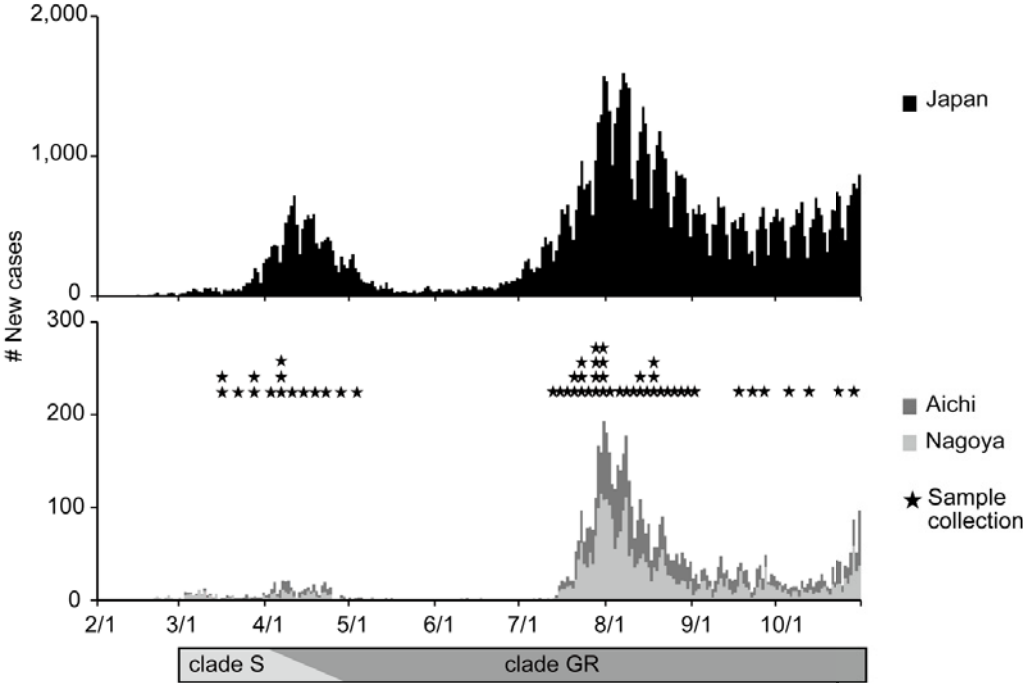
4. 系統樹解析による比較解析

MAFFT[13)]にて各配列をアライメントした．既報に従って IQ-TREE 2[4)14)]にて，Bootstrap test は 1,000 回試行し，Maximum likelihood tree を推定した．得られた系統樹の描画は MEGA7[15)]を使用した．日本の SARS-CoV-2 ゲノム配列は，2020 年 10 月 31 日までに GISAID EpiCoV（https://www.gisaid.org/）あるいは GenBank（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）の公開データベースに登録された SARS-CoV-2 近全長配列（＞29,000 塩基）のうち，5'-及び 3'-非翻訳領域を除く全領域を使用した．両データベースへの重複登録と推定される配列では GenBank のデータのみを利用した．国外の代表配列には GISAID EpiCoV に登録された近全長配列のうち，3 配列以上登録されている同一配列を *in house* プログラムにて抽出し，比較対象として利用した（3,545 配列）．さらに両データベースに登録されたすべての近全長配列（それぞれ 71,623 本，20,897 本の N を含まない配列）に対して，日本から登録された配列で特徴的な変異の有無を *in house* プログラムにて検索した．

結　　果

2020 年 10 月末日までの期間において，国内の SARS-CoV-2 の流行は，第 1 感染ピークとなった 4 月までの時期，ならびに第 2 感染ピークとなった 6 月以降の時期に大きく区分される．この傾向は，本研究が

Fig. 1　Daily number of new SARS-CoV-2-infections in Japan, Aichi, and Nagoya (Feb-Oct, 2020). The upper and lower graphs represent the cases reported in Japan and Aichi/Nagoya, respectively. The stars indicate the cases at our hospital. The clades of the isolated samples are shown in the bottom.



行われた愛知県や名古屋市でも認められた（Fig. 1）．本研究では，当院にて陽性と判明し国内で感染した有症状感染者（異なる 55 症例）の検体を対象に，NGS により SARS-CoV-2 のゲノムの近全長配列（nucleotide：nt 31-29,850）を決定した．決定した配列は GISAID　EpiCoV に EPI_ISL_568556～568576，EPI_ISL_636989～637021 ならびに EPI_ISL_637075 として登録した．解析した検体の採取時期を，Fig. 1に星印で示す．

次に，決定したウイルスゲノム配列について，公共データベース（GISAID EpiCoV および GenBank）にて公開された国内の配列および諸外国の代表配列と比較した．諸外国でのウイルス感染に起因していることが想定される，国内の空港検疫ならびにダイヤモンド・プリンセス号（clade O）[16]，ナイル川クルーズ船（clade GH）[17]での感染症例の配列については，解析対象から除外した．遺伝系統学的解析により，第 1 感染ピーク期における当院の検体のウイルスゲノム配列は，clade S（5 件）と clade GR（10 件）に分類され，症例数が少ないものの，1～3 月期から 4～5 月期への時間経過と共に clade S から GR へとシフトした．こうした状況は，関塚らにより報告された，首都圏を中心とした全国の分子疫学的情報とも合致している[6]．Fig. 2のように，国内の既登録ウイルス配列は clade L および S，G，GH，GR，O のいずれかに分類され（Fig. 2では東京都と神奈川県の配列のみをハイライトしている），時間経過とともに clade S から GR へと主流遺伝子型がシフトしている．これらの配列情報から，第 1 感染ピークにおいて，当院も含め国内の SARS-CoV-2 の遺伝子型は武漢関連型からヨーロッパ型へと移行し，各遺伝子型は分散していた．また，1 配列（GISAID EpiCoV # EPI_ISL_637075，5 月に採取）は，Orf（Open reading frame）7a 領域に 85 塩基の欠失（nt：27,556～27,640）が認められ，推定上 Orf7a が発現されない変異型（*orf7a* Δ85）が検出された．

次に，第 2 感染ピーク期となる 6 月以降のウイルス配列に着目する．公共データベースには，6 月の検体の配列として，東京都と神奈川県のものがそれぞれ 14 件と 1 件公開されている．これら配列と当院の 6～10 月の 40 のウイルス検体の配列を比較解析した結果，40 の配列はすべて東京都の 6 月の全配列と共に clade GR に属する 2 つのクラスターのいずれかに含まれた（Fig. 2，i と ii）．本研究で決定した 6 月以降のウイルス配列は，東京都の検体の配列と遺伝距離が近いことが示され，東京都と名古屋市間で分子疫学的に関連性が高かった．また，2 種類のクラスターがあることから，2 種類以上の複数の感染伝播ルートがあったこと

Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree of SARS-CoV-2.

The viral sequences for samples from Japan and representative sequences reported from other countries are used. Our determined sequences (closed circles) and the sequences reported from Tokyo or Kanagawa (clear squares) are colored according to the sample collection period. Three major domestic clusters that contain recently collected samples (Jun-Oct) are shown with colored backgrounds and arrows. On the right, the virus names and the sample collection months deposited in GISAID and/or GenBank are denoted in the enlarged view of the three clusters.

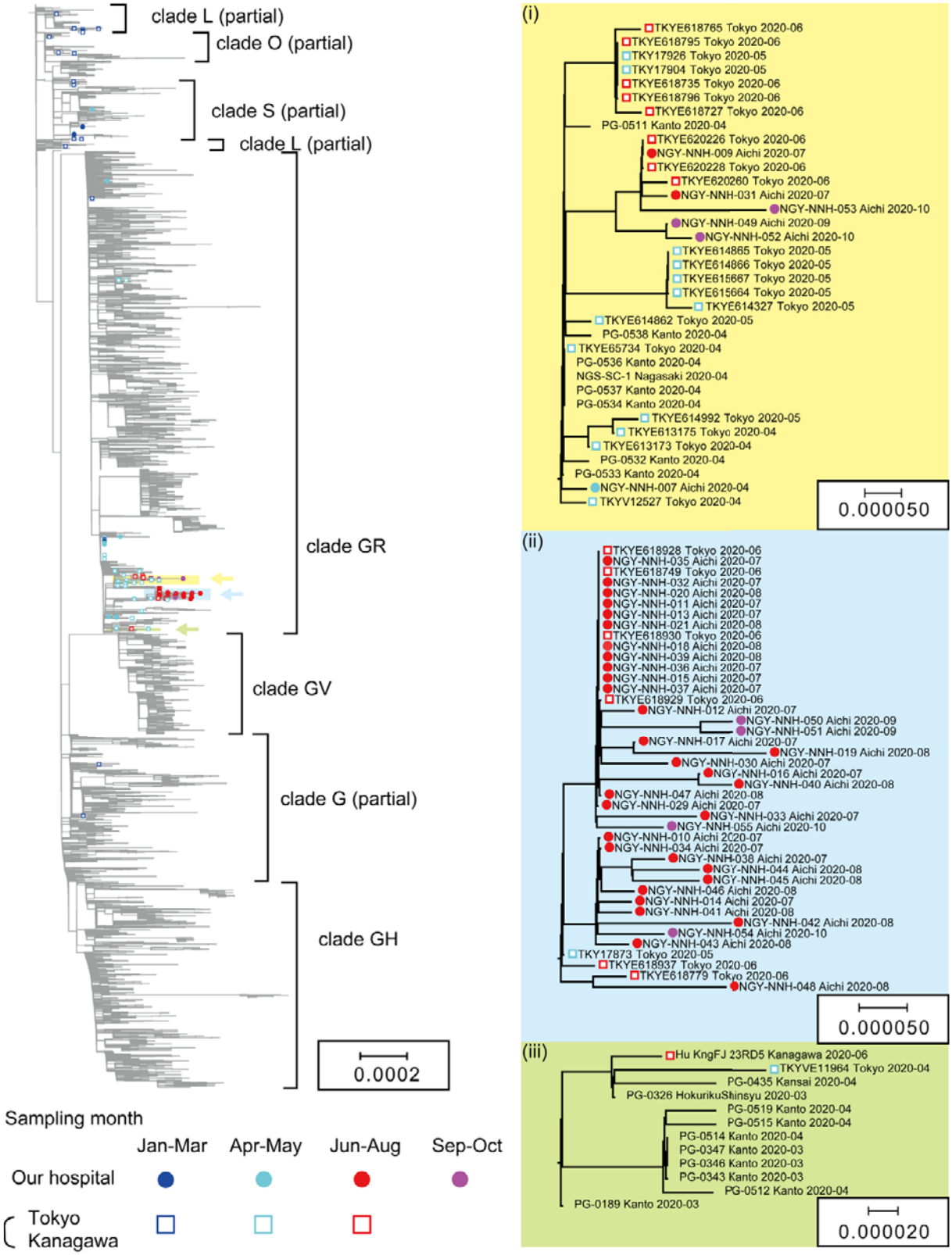


Table 1　Unique synonymous and non-synonymous mutations in the sequences of our recent clusters

Coding region	Nsp1	Nsp3		Nsp4	Nsp5	Nsp12		Spike	Orf3a	Nucleocapsid			
Amino acid in reference	L	F	S	N	P	P	A	D	Q	P	R	G	M
Residue Position	16	106	543	244	108	323	423	614	57	151	203	204	234
(i)*	L†	F†	S	N	P	L	A	G	Q	P	K	R	I
(ii)*	L†	F†	P	N†	S	L	V	G	Q	L	K	R	M
(iii)*	L†	F†	S	N	P	L	A	G	H	P	K	R	M

* The cluster IDs that correspond to those shown in Fig. 2.
† Synonymous mutation.

が示唆された．一方，神奈川県の6月の配列は別のクラスターで独立して観察された．さらに注目すべきことに，これら3つのクラスターは，データベース上の諸外国由来の代表配列を含まず，独立して，クラスターを形成していた．したがって，入国・渡航制限がはじまって以降の第2感染ピーク期においては，日本国内ではSARS-CoV-2が独自の遺伝的変化を遂げたものと考えられる．

これらのクラスターで共通するアミノ酸変異を解析したところ（Table 1），クラスター（i）ではNsp12 P323LおよびSpike D614G，Nucleocapsid R203K/G204R/M234I，クラスター（ii）ではNsp3 S543PおよびNsp5 P108S，Nsp12 P323L/A423V，Spike D614G，Nucleocapsid P151L/R203K/G204Rの非同義変異が認められた．各変異の組み合わせは，諸外国の代表配列には存在しなかった．さらに公開データベースの登録配列を検索したところ，クラスター（ii）に属する1配列（GISAID EpiCoV #EPI_ISL_593712が，8月にオーストラリアで採取）のみが検出された．しかし，その後，オーストラリアで同一種の配列をもつウイルス配列が報告されていない．時系列を考慮すると，少なくともこれら2つの遺伝的クラスターを形成し，国内固有の遺伝的変化が起こっていた可能性を支持する．

考　察

国内におけるSARS-CoV-2の分子疫学的動向と特徴を明らかにしようと，SARS-CoV-2ゲノム配列を解析した．本研究では，第2感染ピーク期以降に，第1感染ピーク期とは異なり，clade GRに属する配列のみに集約する状況を観察した．これは，第1感染ピーク期後の感染者数激減にともなう遺伝的なボトルネック効果による可能性，ならびに海外からの異なる遺伝子型のウイルスの感染流入が抑制されていた可能性，clade GRのウイルスの伝播効率が高い可能性などが複合的に重なったと考えられる．clade GRのウイルスの伝播効率変化については，当該cladeに共通しているSpike D614G変異の感染効率を高める作用あるいは中和抗体への感受性を高める作用が報告されている[18)～21)]．重要なこととして，本研究により検出されたclade GRの配列は，諸外国の代表配列とは異なり，国内独自のクラスターを形成していたことにある．国内独自のウイルス遺伝子型に集約した時期は，2020年3月下旬から10月下旬までの本邦における渡航制限があった時期とも相関しており，これにより海外からの異なる遺伝子型のウイルスの感染流入が抑制されていたと考えられる．こうした地域独自の遺伝学的クラスター形成は，同じく渡航制限を課した諸外国でも観察されており，SARS-CoV-2ゲノム配列の地域差につながるかもしれない．例えば，米国ではOrf8 S24L[22)]，ヨーロッパではSpike A222V[23)]，オーストラリアではSpike S477N[24)]というような地域に特徴的な変異型が報告されている．

次に，遺伝系統樹解析の視点から考察した．国内における感染・伝播の方向性に関して，当院で採取された検体のウイルスゲノム配列は，東京都の検体のウイルスゲノム配列と遺伝的に近いことから，東京都―名古屋市間で感染伝播のつながりがあった可能性が考えられる．しかしながら，日本国内における，特に6月以降のウイルスゲノム配列情報が少ないことから，現時点では，伝播の方向性を検証することは困難である．国内の分子疫学的な動向を把握するためにも，今後，他地域におけるウイルスゲノム配列情報は必要である．

本研究で解析した検体は軽度あるいは中度の有症状患者症例由来の検体が中心であったが，症状の有無によるゲノムに差は無いと考えられる．まず，有・無症状者間でウイルスの遺伝的な違いが生じた場合には経時的に，特に第2感染ピーク期で，有症状者においてもウイルスの遺伝学的な変化が観察されると考えられるが，こうした変化が認められなかったからである．実際に，同一施設内で感染した有・無症状者間におけるウイルス配列の差異が認められず[25)]，有症状者と無症状者が，同程度の量のウイルスを放出するとの報告もある[26)]．しかし，本研究では解析数にも限りがあるため，今後，地域や検体数を拡大した分子疫学的調査が必要となるであろう．

SARS-CoV-2ゲノムは，他のRNAウイルスに比べウイルス自体の変異出現速度は明らかに小さい[2]．しかし，急速な世界的な感染拡大により，短期間でSARS-CoV-2ゲノムには地域差を有した変異が蓄積し，遺伝的多様性が拡大・加速しつつある．現時点では，ウイルスの病原性に関与する，科学的に論じられた明白な変異情報は，シンガポールで検出された*orf8* Δ382（nt：27,848～28,229欠失）のみである[27]．一方，本研究で検出された*orf7a* Δ85（nt：27,556～27,640）変異型SARS-CoV-2の1症例については，米国においても異なる欠失型*orf7a* Δ81（nt：27,404～27,484）型が報告されているが[28]，ウイルスの病原性との因果関係は明らかになっていない．病原性―変異との関連性とは対照的に，免疫―変異との関連性は報告されつつあり，特に，ウイルス受容体であるACE2（angiotensin converting enzyme 2，アンギオテンシン変換酵素2）への結合に重要なSpikeタンパク質上の受容体結合モチーフ（RBM：receptor-binding motif）周辺に遺伝的多様性が生じている．英国とオーストラリアでは，それぞれN439KとS477Nの登録数が増加しており，これらの変異は一部の中和抗体に対して抵抗性を示すことが報告されている[29)30]．最近では，オランダやデンマークでのミンク―ヒトの種間伝播においてRBM結合変異型Spike Y453Fが出現している[31]．おそらく，ワクチンや抗体治療の標的とも重なるため，ワクチンや治療薬導入に伴うウイルスの遺伝的変化を分子疫学的な観点で，その動向を把握することは一層重要となる．さらに，日本も含め全世界的に，拡大するSARS-CoV-2の遺伝的多様性を監視する必要もある．ウイルスの遺伝的多様性が高まれば，ワクチンや治療薬に対する耐性ウイルスが出現するチャンスも高まると考えられる．そのため，これから導入されるであろうワクチンや治療薬を有効に活用するためにも，SARS-CoV-2の遺伝的多様性を抑える「従来の基本的な感染予防対策」は当然重要であるが，継続的な分子疫学的調査も必要不可欠であるといえよう．

本研究では，国内のウイルスの特徴を解明すべく，SARS-CoV-2ゲノム解析を実施した．第2感染ピーク以降では，第1感染ピーク期とは異なり，SARS-CoV-2ゲノム配列は国内で独自に変化したと推定される遺伝子型として集約していたことが観察され，東京都―名古屋市間の分子疫学的な類似性を認めた．これらの情報は，今後のSARS-CoV-2感染症の分子疫学的動向と特徴を把握するための一助となると考えられる．

謝辞：本研究を実施するにあたり，検体を供与くださった患者様ならびに治療，検査に携わった当院の医療スタッフに深謝申し上げます．本研究（の一部）は，一般財団法人　愛知健康増進財団からの医学研究・健康増進活動等の助成（2020年　岩谷靖雅）により遂行された．

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文　献

1) Wu Z, McGoogan JM：Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China：Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020；323：1239–42.
2) Rausch JW, Capoferri AA, Katusiime MG, Patro SC, Kearney MF：Low genetic diversity may be an Achilles heel of SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020；117：24614–6.
3) Smith EC, Denison MR：Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. Curr Opin Virol. 2012；2：519–24.
4) Rambaut A, Holmes EC, O'Toole A, Hill V, McCrone JT, Ruis C, *et al.*：A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. Nat Microbiol. 2020；5：1403–7.
5) Mercatelli D, Giorgi FM：Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. Front Microbiol. 2020；11：1800.
6) Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Kawano-Sugaya T, Tanaka R, Yatsu K, *et al.*：A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan. mSphere. 2020；5：e00786-20.
7) Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RWAL, van der Meer Y, Caly L, *et al.*：SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells：replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. J Gen Virol. 2020；101：925–40.
8) Moreno GK, Braun KM, Halfmann PJ, Prall TM, Riemersma KK, Haj AK, *et al.*：Limited SARS-CoV-2 diversity within hosts and following passage in cell culture. bioRxiv. 2020； doi：https://doi.org/10.1101/2020.04.20.051011.
9) Kechin A, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M：cutPrimers：A New Tool for Accurate Cutting of Primers from Reads of Targeted Next Generation Sequencing. J Comput Biol. 2017；24：1138–43.
10) Li H, Durbin R：Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2009；25：1754–60.
11) Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.*：The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009；25：2078–9.
12) Ode H, Matsuda M, Matsuoka K, Hachiya A, Hattori J, Kito Y, *et al.*：Quasispecies Analyses of the HIV-1 Near-full-length Genome With Illumina MiSeq. Front Microbiol. 2015；6：1258.
13) Nakamura T, Yamada KD, Tomii K, Katoh K：

Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. Bioinformatics. 2018；34：2490–2.
14) Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, *et al.*：IQ-TREE 2：New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020；37：1530–4.
15) Kumar S, Stecher G, Tamura K：MEGA7：Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016；33：1870–4.
16) Sekizuka T, Itokawa K, Kageyama T, Saito S, Takayama I, Asanuma H, *et al.*：Haplotype networks of SARS-CoV-2 infections in the Diamond Princess cruise ship outbreak. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020；117：20198–201.
17) Sekizuka T, Kuramoto S, Nariai E, Taira M, Hachisu Y, Tokaji A, *et al.*：SARS-CoV-2 Genome Analysis of Japanese Travelers in Nile River Cruise. Front Microbiol. 2020；11：1316.
18) Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, *et al.*：Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike：Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. Cell. 2020；182：812–27 e19.
19) Ozono S, Zhang Y, Ode H, Sano K, Tan TS, Imai K, *et al.*：SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. Nat Commun. 2021；12：848.
20) Plante JA, Liu Y, Liu J, Xia H, Johnson BA, Lokugamage KG, *et al.*：Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. Nature. 2020；592：116–21.
21) Hou YJ, Chiba S, Halfmann P, Ehre C, Kuroda M, Dinnon KH 3rd, *et al.*：SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. Science. 2020；370：1464–8.
22) Wang R, Chen J, Gao K, Hozumi Y, Yin C, Wei G：Characterizing SARS-CoV-2 mutations in the United States. Res Sq. 2020 Aug 11；rs.3.rs-49671. doi：10.21203/rs.3.rs-49671/v1. Preprint.
23) Hodcroft EB, Zuber M, Nadeau S, Crawford KHD, Bloom JD, Veesler D, *et al.*：Emergence and spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. medRxiv. 2020 Nov 27；2020.10.25.20219063. doi：10.1101/2020.10.25.20219063. Preprint.
24) Chen AT, Altschuler K, Zhan SH, Chan YA, Deverman BE：COVID-19 CG enables SARS-CoV-2 mutation and lineage tracking by location and dates of interest. ELife. 2021；10：e63409.
25) Ladhani SN, Chow JY, Janarthanan R, Fok J, Crawley-Boevey E, Vusirikala A, *et al.*：Investigation of SARS-CoV-2 outbreaks in six care homes in London, April 2020. EClinicalMedicine. 2020；26：100533.
26) Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, *et al.*：Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. N Engl J Med. 2020；382：2081–90.
27) Young BE, Fong SW, Chan YH, Mak TM, Ang LW, Anderson DE, *et al.*：Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response：an observational cohort study. Lancet. 2020；396：603–11.
28) Holland LA, Kaelin EA, Maqsood R, Estifanos B, Wu LI, Varsani A, *et al.*：An 81-Nucleotide Deletion in SARS-CoV-2 ORF7a Identified from Sentinel Surveillance in Arizona (January to March 2020). J Virol. 2020；94：e00711–20.
29) Thomson EC, Rosen LE, Shepherd JG, Spreafico R, da Silva Filipe A, Wojcechowskyj JA, *et al.*：Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. Cell. 2021；184：1171–87.
30) Liu Z, VanBlargan LA, Bloyet LM, Rothlauf PW, Chen RE, Stumpf S, *et al.*：Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. Cell Host Microbe. 2021；29：477–88.
31) Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, *et al.*：Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. Science. 2021；371：172–7.

Molecular Epidemiological Insights into Transmission Trends in Nagoya Area Based on SARS-CoV-2 Genome Sequencing (Mar-Oct, 2020)

Yoshihiro NAKATA[1)2)], Hirotaka ODE[1)], Mai KUBOTA[1)], Kazuhiro MATSUOKA[1)], Masakazu MATSUDA[1)], Miho NAKASUJI[1)], Mikiko MORI[1)2)], Mayumi IMAHASHI[1)], Yoshiyuki YOKOMAKU[1)] & Yasumasa IWATANI[1)2)]

[1)]National Hospital Organization Nagoya Medical Center, [2)]Nagoya University Graduate School of Medicine

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the etiologic agent of coronavirus disease (COVID-19) which has spread rapidly worldwide to cause a global pandemic. The SARS-CoV-2 genome shows a lower mutation rate than other RNA viruses. However, because of the ongoing rapid worldwide transmission among humans, the genetic diversity of the SARS-CoV-2 genome has increased. In Japan, a previous study suggested that the distinct viral clades L, S, G and GR of SARS-CoV-2 had been imported from overseas and begun to circulate domestically by April 2020. However, little is known about molecular epidemiology of SARS-CoV-2 since then, because of the lack of sufficient information on the viral genome sequence information in Japan. Herein, to probe the molecular epidemiological trends in Japan, we determined the full genome sequences of SARS-CoV-2 (n=55) derived from patients admitted to our hospital and performed a comparative analysis with domestic and international sequence information available from GISAID and GenBank. The results showed that the dominant domestic genotypes, including our determined sequences, had shifted from clades S and L to clades G and GR, and dispersed widely during the first infection peak period (March to April). In contrast, all the SARS-CoV-2 genotypes after May 2020 are highly clustered as unique clade GR genotypes that are not detected outside Japan. This genetic clustering occurred during the period under which restrictions were placed on overseas travel in Japan. Similar trends of viral genotype clustering have also been observed worldwide, with regional disparities. Under these circumstances, we should adopt adequate preventive measures to prevent the viral genetic diversity from increasing, and also further extend the molecular epidemiological survey of SARS-CoV-2 genotypes in Japan. These efforts will aid in ensuring successful use of the novel vaccines and antiviral drugs in the near future.