

---

# 東京都微生物検査情報

## MONTHLY MICROBIOLOGICAL TESTS REPORT, TOKYO

---

第41巻 第9号  
2020年 9月号  
月 報



東京都健康安全研究センター

*<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>*

---

ISSN 1883-2636

## ～今号の話題～

### 次世代シーケンサーを用いた新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)ゲノム解析の有用性

一般にウイルスを解析する場合、そのウイルス遺伝子の塩基配列を決定した後、比較したいウイルス株の塩基配列（参照配列：他の国や地域で検出されたウイルス）を遺伝子データバンク（DDBJ、NCBI、GISAID）等から得る。それらすべてを遺伝子解析ソフトウェアで処理し、図1、2に示すような図を作成していく。図1は分子系統樹解析、図2は分子系統ネットワーク解析（ハプロタイプネットワーク解析）と言われるものである。ある一族の祖先代々の系図と似ており、比較対象との遺伝的位置関係を見ることにより相互関係を調べる手法である。比較したい対象と近似性が高い場合には互いに近くに位置し、そうでなければ遠くに位置する。図1、2は新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の系統解析であるが、赤●で示すウイルス株（武漢株）と緑●は比較的近縁であるが、赤●と青●は近くない位置関係にある。その位置関係の差は比較対象との遺伝子変異を示し、青●は赤●や緑●と比較して遺伝子変異していると判断される。

一般に、インフルエンザウイルスのようなRNAウイルスはRNAを複製する酵素が複製ミスを起こしやすいため、変異しやすい。特にインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン（HA）遺伝子は可変領域であり、遺伝子解析を行うためには、数100～1,000塩基のHA領域の塩基配列解析が可能である。また、塩基配列解析のためには、解析領域の物理的な量が必要となる。例えば、インフルエンザ患者の咽頭拭い液等中のウイルスを解析する場合には、PCR法もしくはnested-PCR法によりウイルスの特異的領域を増幅するか、もしくはウイルス分離を行う必要がある。

SARS-CoV-2は全長29,900塩基からなるRNAウイルスである。塩基配列の誤りを校正するエキソヌクレアーゼという修復酵素を有するため、他のウイルスより変異が少なく、変異速度は1年間に24.1か所と言われている（1か月で1～2塩基の変異）。インフルエンザウイルスのHA領域に相当するような特徴的な可変領域は存在しないため、ウイルス株間の比較にはウイルス全体の塩基配列（全長配列）が用いられている。29,900塩基もの全長解析を行う場合には、SARS-CoV-2そのものを培養で増やすか、遺伝子を増やすことが必要となる。

一般に、SARS-CoV-2ゲノム解析は、感染者の臨床検体から抽出したRNAを材料に、PCR法で増幅した遺伝子産物を次世代シーケンサー（NGS）で解析する手法が用いられている。臨床材料から抽出された核酸RNAを98対のプライマーを用いてPCR反応を行い、その増幅産物をNGSにより解析している。この際のPCRにおいてはウイルス量の多い検体でないとPCRで全長を増幅することが困難である。2020年11月に厚生省から発出された要請では、Ct値が30より小さいものを国立感染症研究所（感染研）で解析することとしている。Ct値とは、リアルタイムPCR検査で陽性となった数値の概算であり、Ct値30は30回の増幅（温度の上げ下げ）で陽性となった検体を言い、Ct値が30よりも小さいということは、30回で陽性の検体よりもウイルス量が多い検体であることを意味している。また、NGS用にPCRで増幅した結果、使用したプライマーの塩基配列もNGSにより読まれてしまうため、最終的に98×2=196本のプライマー配列を取り除く作業工程が必要となる。

一方、SARS-CoV-2の培養を行うためには、バイオハザードレベル3（BSL3）実験室で扱わなければならない。ウイルス量の多い検体でないと分離は不可能であり、ウイルスを培養する期間（1～2週間程度）も必要となる。

このような方法で決定されたSARS-CoV-2のゲノム情報は、GISAID (<https://www.gisaid.org/>) 等で世界各地から登録されており、閲覧も可能である。登録内容には、遺伝子配列データの他に、収集日、収集場所、検体種、検査手法等も記載されている。一般にSARS-CoV-2のプロトタイプは武漢株（Wuhan-Hu-1）であり、それを基準として比較されている。

日本におけるSARS-CoV-2のゲノム解析情報は、感染研より、「新型コロナウイルスSARS-CoV-2のゲノム分子疫学調査」として、4月27日（第1回）<sup>1)</sup>、8月5日（第2回）<sup>2)</sup>、12月11日（第3回）<sup>3)</sup>にハプロタイプネットワーク解析として公開されている。内容としては、2019年末の中国・武漢を発端とするウイルス株を起点として、日本各地で初期のクラスターが複数発生したが消失に転じ、2月にはクルーズ船関連の集団発生も認められたがそのタイプも消失し、3月下旬に欧州系統の同時多発と思われるク

ラスターが発生し、全国に拡大したとしている。

世界での分子疫学解析は、NEXTstrain (<https://nextstrain.org/sars-cov-2/>) を参照して頂きたい。NEXTstrainではSARS-CoV-2を19A(L)、19B(S)、20A(G)、20B(GR)、20C(GH)等のサブクレードに分類し、どのように世界各地に蔓延したかを時系列の図式で示している。初期に武漢で発生したサブクレードは19A(L)と19B(S)とされ、19Aから派生した20Aはスパイク蛋白を作る614番目のアミノ酸がアスパラギン酸(D)からグリシン(G)に変わっており(D614G)、その後3月にヨーロッパで大流行し、日本を含む世界中に広がった。さらに、20Aと遺伝的に異なる20Bと20Cも出現している。東京都においても19Aは1月の検体から分離され<sup>4)</sup>、その後、多くのウイルスを分離・解析している<sup>5)</sup>。

また、もう一つゲノム解析の利用方法として、施設内の集団発生の解析に使用される場合がある。施設内で集団感染があった場合、感染がどこから始まり、どのように広がったのかがわからない場合がある。Takenouchiら<sup>6)</sup>はNGS解析の院内感染等におけるNGSの有用性を報告している。細菌を原因とする場合にはPFGE(pulsed-field gel electrophoresis)やVNTR(Variable number of tandem repeat)等が用いられているが、SARS-CoV-2ではNGSによるゲノム解析が疫学調査の一助となる。

SARS-CoV-2が発見され、全世界で感染者が発生し始めて早1年が経つ。先にご紹介したGISAIDでは既に約22万のゲノム配列が登録されている。残念ながら現時点では、ウイルスが弱毒化した証拠はなく、このようなゲノム解析を通じて、都内の状況のみならず、海外からのサブクレードの流入についても注

視していかなければならない。

#### 参考文献

- 1) 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, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/467-genome/9586-genome-2020-1.html>
- 2) 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 (2020/7/16 現在), <https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/467-genome/9787-genome-2020-2.html>
- 3) 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のゲノム分子疫学調査 (2020年10月26日現在) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/2488-idsc/iasr-news/10022-491p01.html>
- 4) Nagashima M., et al, JJID. 2020. 137, DOI <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.137>
- 5) 浅倉弘幸ら、東京都健康安全研究センター年報 (先行公開)、[http://www.tokyo-eiken.go.jp/files/archive/issue/kenkyunenpo/nenpou71/71-07\\_11senkou.pdf](http://www.tokyo-eiken.go.jp/files/archive/issue/kenkyunenpo/nenpou71/71-07_11senkou.pdf)
- 6) Takenouchi T., et al, J.Hospital Infect., 107, 40-44, 2021

(微生物部 貞升健志)

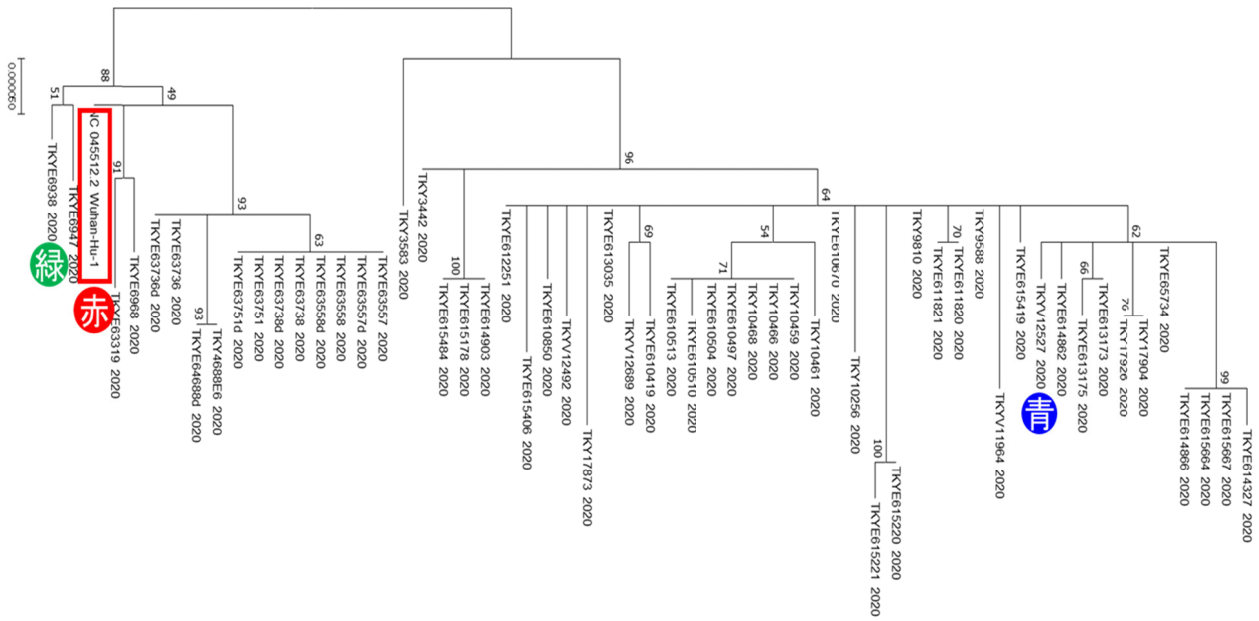


図1. 分子系統樹解析 (SARS-CoV-2 ゲノム)

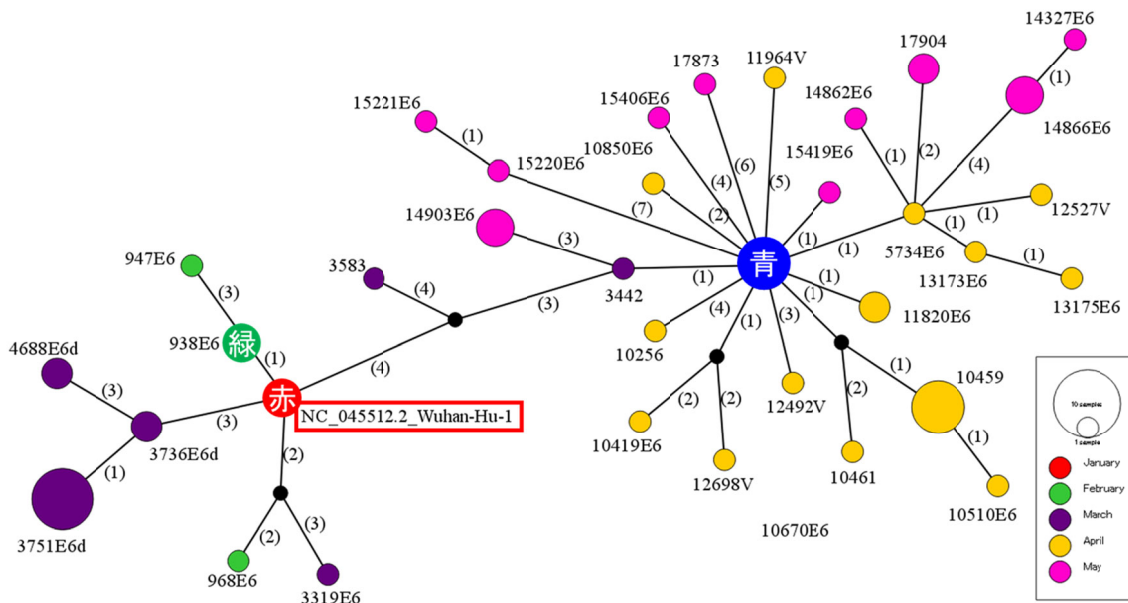


図2. 分子系統ネットワーク(ハプロタイプネットワーク)解析 (SARS-CoV-2 ゲノム)

表1 病原体搬入・検出状況(4種等)※

2020年9月分

機関名		コレラ菌	赤痢菌	チフス菌	パラチフスA菌	腸管出血性大腸菌	結核菌
区	千代田区						
	中央区						
	港区					2	
	新宿区					2	
	文京区					3	
	台東区					2	
	墨田区					2	
	江東区					3	
	品川区					3	1
	目黒区					4	
	大田区					1	
	世田谷区					5	
	渋谷区					6	
	中野区					5	
	杉並区					2	2
	豊島区						
	北区						
	荒川区						
	板橋区					2	
	練馬区					1	
足立区					8		
葛飾区					3		
江戸川区					3		
市	町田市					1	
	八王子市						1
小 計						58	4
都	西多摩					3	
	多摩立川					5	
	南多摩					2	
	多摩府中					5	
	多摩小平					5	
	島しょ						
小 計						20	
合 計						78	4
健康安全研究センター 検出分						14	

※2016年4月より、各保健所から搬入された検体を集計することとした。

表2 検体搬入状況(全数把握対象疾患-五類)\*

2020年9月分

	検体数	2020年累計
侵襲性インフルエンザ菌感染症(菌)	1	23
侵襲性髄膜炎菌感染症(菌)		2
侵襲性肺炎球菌感染症(菌)	5	47
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症(菌)	6	34
播種性クリプトコックス症(菌)		8
合計	12	114

表3 病原微生物検出状況(食中毒関連)

2020年9月分

	菌種名	検体数	2020年累計
細菌	大腸菌		
	毒素原性	130	132
	組織侵入性		
	腸管出血性		6
	その他・不明		
	サルモネラ		
	O4	2	7
	O7		2
	O8		1
	O9		
	その他		
	腸炎ビブリオ		
	プレジオモナス・シグロイデス		1
	カンピロバクター	17	61
黄色ブドウ球菌		12	
A型ウエルシュ菌		71	
ボツリヌス菌		1	
ウイルス	ノロウイルス(G I)		38
	ノロウイルス(G II)	8	334
	ノロウイルス(G I, G II)		4
	ロタウイルス		
	サポウイルス		
寄生虫	アニサキス	3	32
	クドア		
合計		161	703

**表4 HIV 検査数及び陽性数**

2020年9月分

	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都南新宿検査・相談室	643	4	245	0	0	0	888	4
保健所等	31	3	29	0	0	0	60	3
合計	674	7	274	0	0	0	948	7
2020年累計	6,465	81	2,342	0	1	0	8,808	81

**表5 性感染症検査数及び陽性数**

2020年9月分

	梅毒検査		クラミジア遺伝子検査		淋菌遺伝子検査	
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
東京都南新宿検査・相談室	887	59	0	0	0	0
保健所等	69	2	67	1	45	0
合計	956	61	67	1	45	0
2020年累計	8,720	669	1,388	80	1,027	4

**定点把握疾患別病原体分離状況（ウイルス）**

過去 3 ヶ月間にセンターに搬入された定点把握疾患検体から、ウイルスは分離されませんでした。

◆東京都微生物検査情報◆

2020年 12月 21日

編集・発行

東京都健康安全研究センター

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-24-1

TEL:03-3363-3213

FAX:03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>