東京都内で検出された新型コロナウイルスの次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

(2020年2月~5月)

浅倉 弘幸^a,長島 真美^a,熊谷 遼太^a,吉田 勲^b,長谷川 乃映瑠^b,長谷川 道弥^a,藤原 卓士^a,林 真輝^a, 永野 美由紀^a,山崎 貴子^a,河上 麻美代^a,北村 有里恵^a,加來 英美子^a,矢尾板 優^a,森 功次^a, 内田 悠太^a,原田 幸子^a,鈴木 愛^a,糟谷 文^a,小杉 知宏^a,林 志直^a,千葉 隆司^a,貞升 健志^c

2019新型コロナウイルス(2019-nCoV, SARS-CoV-2)は、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の原因となるコロ ナウイルスである.2020年1月に初めて都内でCOVID-19患者が確認された後、3月下旬から5月にかけて感染が拡大し た.今回、2020年2月から5月までに臨床検体およびVero系細胞により分離されたSARS-CoV-2株を次世代シーケンサー (NGS)を用いて解析した.その結果、分離培養株では、臨床検体では認められなかった混合塩基が確認された.さら に、得られた全長配列と武漢で報告された参照株を比較した結果、多数の変異が認められた.系統樹解析では、患者間 に関連する事例で類似の配列を有してクラスターを形成し、また、中国武漢市で報告された株に近縁な「武漢型」およ びスパイク領域にD614Gの変異を有する「欧州型」の2つの系統に大きく分かれた.ハプロタイプ解析の結果では、 2020年2月から3月下旬までは「武漢型」による感染が主であったが、3月下旬以降は「欧州型」による感染拡大が起き たと推定できた.

キーワード: 2019新型コロナウイルス, 2019-nCoV, SARS-CoV-2, COVID-19, 次世代シーケンサー, NGS

はじめに

2019新型コロナウイルス (2019-nCoV, 以下, SARS-CoV-2) は,新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)の 原因となるコロナウイルスである. SARS-CoV-2による感 染は,2019年12月に中国湖北省武漢市で発生が初めて確認 された.その後,瞬く間に世界中へ広がり,世界的流行 (パンデミック)を引き起こしている.

東京都内で初めてSARS-CoV-2の感染者が確認されたの は2020年1月24日であり、中国武漢市からの旅行者であっ た¹⁾. その後、2020年2月13日には都内在住者で初めての 感染が確認された後²⁾、 3月下旬から急速に感染が拡大 し、4月初旬から中旬にはピークに達した. 5月中旬以 降、新規患者報告数は減少し、5月末時点では第1波はほぼ 収束に向かいつつあった.しかし、その後も毎日複数名の 感染が確認されている状況が続いており、終息まではさら なる期間を要すると考えられる.

SARS-CoV-2の感染が世界的規模で拡大している中,ウ イルスのゲノム配列は流行とともに変異している.現在, 世界各地からSARS-CoV-2のゲノム情報が収集され,公開 されている.公開されている情報から,多数の変異が報告 されており^{3,4)}.また,地域によって流行する株の病原性 や感染性などの関連についても検討されている^{5,6)}.さら に,これらの情報から,蓄積された遺伝情報の変化を追跡 することによって,ウイルスの進化の様子や感染の伝播経 路についても研究されている").

そこで今回,都内で検出されたSARS-CoV-2の全長塩基 配列を次世代シーケンサー(NGS)を用いて決定し,解 析を行ったので報告する.

実験方法

1. 材料

2020年2月1日から5月31日までに都内の医療機関にて新型コロナウイルス感染症が疑われて搬入された臨床検体34件(咽頭ぬぐい液,鼻咽頭ぬぐい液または喀痰)および Vero系細胞により臨床検体から分離されたウイルス株46株 を試料とした.

2. 遺伝子検査

1) リアルタイムPCR法

患者の臨床検体からQIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した.抽出したRNAを 鋳型にし,Quantitect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)により リアルタイムRT-PCRを行った.リアルタイムPCR装置は QuantStudio 12K Flex Realtime PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いた.PCR反応条件は、50°C30分の逆転 写反応を行い、95°C 15分で酵素の失活を行った後に、 94°C 15秒,60°C 1分を45サイクル行った.

SARS-CoV-2検出用のプライマーおよびプローブとして

- ^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
- 東京都健康安全研究センター微生物部

orflab-13215-F/orflab-13257-R, orflab-13238-P⁸⁾, および NIID_2019-nCOV_N_F2/NIID_2019-nCOV_N_R2, NIID_2019-nCOV_N_P2⁹⁾をそれぞれ用いた.

2) NGS解析

リアルタイムPCR法により, SARS-CoV-2が検出された 検体について,検出されたSARS-CoV-2の全長配列をNGS を用いて決定した.ライブラリー作成に用いたRNAは, 臨床検体,またはVero系細胞を用いて分離培養したウイ ルス株をQIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いて 抽出した.NGSのライブラリー作成にはNEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)を用い, MiSeq (Illumina)を使用してデータを取得した.得られたデー タはCLC genomic work bench (CLC bio)を用いてコンテ ィグを作成し、参照株へマッピングした.参照株には Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2)を用い、変異部位を探索する とともに、MEGA7を用いて系統樹解析を行った.

また,得られた配列をPop Art version 1.7¹⁰(フリーソフト)を用いてMedian-joining法によりハプロタイプネットワーク図の作成を行った. さらに,DnaSP version 6.12.03¹¹⁾(フリーソフト)を用いて塩基多様度 π ,ハプロタイプ多様度h,Tajima's D値を算出した.

結 果

1. 臨床検体と分離培養株の比較

リアルタイムPCRにてSARS-CoV-2陽性となった検体の うち、臨床検体34検体、および分離培養株40株をNGSに て解析した. このうち, 分離培養株はすべて全長を解読す ることができたが、臨床検体で全長の解読が可能であった のは34検体中12検体(35%)であった.分離培養株のう ち、6株は途中3塩基の欠失を含む株が認められた.これ ら全長を取得することができた臨床検体12検体、分離培養 株40株および欠失部位が存在する6株の計58株については GenBankに登録し、Accession Noを得た(表1). 同一検体 で臨床検体と分離培養検体のどちらも解析を行った9検体 について、de novoアセンブリの評価を行った(表2). そ の結果,いずれの検体においても平均Contig長,最大 Contig長,N50は臨床検体より分離培養株で大きくなっ た. また, Contig数はF3736, F4688の2検体では分離培養 株の方が多くなったが、他7検体は臨床検体の方が多くな った.

得られた配列データを参照株にあわせてマッピングした 際,分離培養株で混合塩基となっている箇所が認められ た.そこで,混合塩基が確認された分離培養株のうち,6 株について臨床検体の配列と比較した(表3).6株の分離 培養株から混合塩基部位が見られた計16箇所のうち,3箇 所は混合塩基であったが,13箇所は参照配列と一致してい た.なお,混合塩基以外の箇所はすべて分離培養株と臨床 検体で配列は一致していた.

2. 変異の探索

今回解析した全ての臨床検体および分離培養株と武漢で 初めて報告された参照株との間に1~16塩基の違いが認め られ、参照株と同じ配列を持つ臨床検体および分離培養株 は見られなかった.また、C241T、C313T、C3037T、 C14408T、A23403G、G28881A、G28882A、G28883Cの8 箇所で特に変異が多く見られ(表4)、さらに、これらは 同時に有している株が多かった.

表2. 臨床検体と分離培養検体のアセンブリ評価比較

検体番号		Ct値 (orf1ab/N2)	Contig数	N50 (bp)	平均Contig長(bp)	最大Contig長(bp)
1020	臨床	19.7/20.3	320	486	497	3303
F938	培養		37	3919	1287	8545
5069	臨床	16.1/16.0	269	528	512	3005
1908	培養		82	1720	964	29832
E2210	臨床	16.6/13.8	284	481	489	3913
F3519	培養		176	934	709	24138
F3557	臨床	27.1/23.1	194	416	411	1543
	培養		145	1038	748	29363
F3558	臨床	25.9/21.9	172	461	469	1994
	培養		89	1560	902	24135
F3736	臨床	24.0/20.5	172	461	469	1994
	培養		239	708	656	19654
F3738	臨床	21.6/18.0	340	504	501	6701
	培養		70	2213	1088	24112
F3751	臨床	21.1/17.8	530	465	471	2232
	培養		90	1641	925	24125
E4699	臨床	20.2/16.9	195	433	438	1756
F4088	培養		519	500	554	29798

3. 分子系統樹解析

全長を取得できた臨床検体12株,分離培養46株および1 件の参照配列を合わせた計59株について系統樹解析を行っ た結果,患者に共通する事例(ダイヤモンドプリンセス号 関連,病院集団感染事例A~D.特別養護老人ホーム感染 事例A,B)ごとにクラスターを形成した(図1).さら に、参照配列(Wuhan-Hu-1, NC_045512.2)を含む系統 (武漢型)と,別の系統(欧州型)の大きく2つの系統に 分類された.武漢型はダイヤモンドプリンセス号関連やA 病院集団間事例などを含む3月下旬までに搬入された検体 で構成された.一方,欧州型では、3月中旬からの欧州か らの帰国者を始め、4月から5月にかけてのすべての検体 が含まれていた.

表3. 臨床検体と分離培養株の配列比較

_	検体番号	位置	分離培養株中の 塩基	臨床検体中の 塩基	参照配列
	E029	17107	C or T	Т	Т
	F938	26333	C or T	С	С
	E069	3814	C or T	Т	Т
	1908	23525	C or T	С	С
-	F2210	886	C or T	C or T	Т
_	F3319	16564	G or T	G	G
		6194	C or T	C or T	С
		8602	A or G	G	G
	E2729	9533	A or T	А	А
	F3/38	15942	A or G	А	А
		20055	A or G	А	А
		22088	C or T	C or T	С
	E2761	17576	A or C	А	А
	F3/31	21835	T or C	Т	Т
	E10670	21691	C or T	С	С
_	F106/0	25681	A or G	G	G

表 1. SARS-CoV-2 全長配列の系統樹解析に用いた検体

PR 単原体体 PR PR ●原体体 PR PR ●原体体 PR	検体番号	検体種	株名	Accession No	搬入日	関連	D614Gの変異に よる分類 ¹²⁾	ハプロタイプ 番号	備考
ImpaImpa ImpaImpa Impa Impa Impa Impa Impa 	F938	培養検体	TKYE6938_2020	LC553269	2/14	ダイヤモンドプリンセス号	武漢型	H1	
ImageImageImageImageImageImageImageImageImageMarketNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImageNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalNormalImage<	F947	培養検体	TKYE6947_2020	LC542809	2/14	ダイヤモンドプリンセス号	武漢型	H2	
Interpress Press Press Press 	F968	培養検体	TKYE6968_2020	LC542976	2/17		武漢型	H3	
Interp Rate B Rest B	F3319	培養検体	TKYE63319_2020	LC581364	3/18		武漢型	H4	
Parter	F3442	臨床検体	TKY3442_2020	LC553270	3/21	海外渡航歴 (イギリス・イタリア)	欧州型	H8	
Number Number Number Number Number Number P330 Rate Number Number Number Number P331 Rate Number Number Number Number Number P331 Rate Number Number Number Number Number Number Number P331 Rate Number <	E2557	拉参校休	TKYE63557_2020	LC581365	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
<table-container> Phys. <t< td=""><td>F3337</td><td>增費便僅</td><td>TKYE63557d_2020</td><td>LC581366</td><td>3/23</td><td>A病院集団感染</td><td>武漢型</td><td>H7</td><td>TKYE63557_2020から3塩基欠失株</td></t<></table-container>	F3337	增費便僅	TKYE63557d_2020	LC581366	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63557_2020から3塩基欠失株
Construct Number of the second	E2558	应差检休	TKY3558E6_2020	LC581367	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
Physic Partial Partin Partial Partin Partial Partial Partin Partial Partial Partial P	13558	70 30 19 IP	TKYE63558d_2020	LC581368	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63558_2020から3塩基欠失株
<table-container> Partial <</table-container>	F3583	臨床検体	TKY3583_2020	LC549340	3/23	海外渡航歴 (スペイン)	欧州型	H9	
Instance Instance Instance Instance Instance Instance Instance PPP Presentation Instance Instance Instance Instance Instance PPP Presentation Instance Instance Instance Instance Instance Instance PP Presentation Instance	E2726	应差检休	TKYE63736_2020	LC581369	3/25	A病院集団感染	武漢型	H5	
Physe Physe <t< td=""><td>15750</td><td>20 JR 17 19</td><td>TKYE63736d_2020</td><td>LC581370</td><td>3/25</td><td>A病院集団感染</td><td>武漢型</td><td>H5</td><td>TKYE63736_2020から3塩基欠失株</td></t<>	15750	20 JR 17 19	TKYE63736d_2020	LC581370	3/25	A病院集団感染	武漢型	H5	TKYE63736_2020から3塩基欠失株
Number	F3738	应差给休	TKYE63738_2020	LC581371	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
<table-container> Phem PhysRep PhysRep Constraint Fined</table-container>	19790	20 JR 17 19	TKYE63738d_2020	LC581372	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63738_2020から3塩基欠失株
Norm Norm Network Ne	F3751	应差给休	TKYE63751_2020	LC581373	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
Phem Phythesses Protesses Constant Constant Constant Constant Constant Constant 19734 Raffer Nitresses Constant Constant Raffer Nitresses	19751	20 JR 17 19	TKYE63751d_2020	LC581374	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63751_2020から3塩基欠失株
IntermTry Try Back Back 2000LCSB 137J 31Try Back 3000Try Try	F4688	培養給体	TKYE64688_2020	LC581375	3/31		武漢型	H6	
F>794W#M*INVEX071_2000LCS96.134.2MAMEMAMEHIP9588BKRM*TXV9058_2020LCS92.284.16KAMEH0F10205BKRM*TXV1025_2020LCS92.294.18KAMEH1F10406BKRM*TXV1045_2020LCS92.20LCS92.20LCS92.20H1KAMEH1F1046BKRM*TXV1045_2020LCS92.204.18BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1045_2020LCS92.204.18BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1045_2020LCS93.234.18BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1640_2020LCS93.134.19BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1640_2020LCS93.134.19BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1640_2020LCS93.134.19BRRKBIBKKMIEH1F1046BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.20BRRKBIBKKMIEH1F1047BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.20BRRKBIBKKMIEH1F1048BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.21KMIEKMIEH1F1044BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.21KMIEKMIEH1F1044BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.49KMIEKMIEH1F1044BKRM*TXV1640_2020LCS93.124.49KMIEKMIEH2F11	14000	20 JR 17 19	TKYE64688d_2020	LC581376	3/31		武漢型	H6	TKYE64688_2020から3塩基欠失株
PS88紙林梯TXY958,200LCS322416成机型机机型110P910編林橋TXY1052,200LCS323418成机型112P1040湯東橋TXY1052,200LCS323418成机型113P1040編水橋TXY1042,200LCS323418四方電気間感染水机型113P1046編水橋TXY1045,200LCS323418四方電気電感染水机型114P1046編水橋TXY1045,200LCS323418四方電気電感染水机型114P1046瑞橋橋TXY1045,200LCS333419四方電気電感染水机型114P1046瑞橋橋TXY1045,200LCS331419四方電気電感染水机型114P1047瑞橋橋TXY161050,200LCS310419四方電気電感染水机型114P1048瑞橋橋TXY161050,200LCS310419四方電気電感染水机型114P1049瑞橋橋TXYE61050,200LCS310419四方電気電感染水机型114P1040湯橋橋TXYE61051,200LCS310420本防気電電影秋机型114P1041湯橋橋TXYE61051,200LCS310420A水気電秋机型114P1040湯橋橋TXYE61051,200LCS310420AA秋川型第14114P1040湯橋橋TXYE61051,200LCS310420AA第14114114P1040湯橋橋TXYE61051,200LCS310421AAA第14114114P1141湯橋TXYE61052,20	F5734	培養検体	TKYE65734_2020	LC556315	4/2		欧州型	H11	
Pix00KXY8610-200LC55.2594/16KR/2B10F125KK/KKY106101-200LC554/18KR/2B13F1040MarkkTXY106101-200LC554/18KR/2B14F1046KK/KTXY1064-200LC554/18B490KBERISKKR/12B14F1046KK/KTXY1046-200LC554/18B490KBERISKKR/12B14F1046KK/KTXY1046-200LC554/18B490KBERISKKR/12B14F1046KK/KTXY1046-200LC554/19B490KBERISKKR/12B14F1046KK/KTXY10462-200LC554/19B490KBERISKKR/12B14F1047KK/KTXY10462-200LC554/19B490KBERISKKK/12B14F1048KK/KTXY104072-200LC554/20B490KBERISKKK/12B14F1049KK/KTXY104072-200LC554/20A999KBEX/A+-A-X-B2K/12B16F1140KK/KTXY104072-200LC554/20A999KBEX/A+-A-X-B2K/12B16F1141KK/KTXY104072-200LC554/20A999KBEX/A+-A-X-B2K/12B16F1142KK/KTXY10402-200LC554/20A999KBEX/A+-A-X-B2K/12B16F1143KK/KTXY10402-200LC554/20K/12B17B17B17B17F1144KK/KTXY10402-200LC55414/20B99KBEX/A+-A-X-B2K/12B16	F9588	臨床検体	TKY9588_2020	LC553257	4/16		欧州型	H10	
FieldsKaylesKaylesLCSS 20AllsKu/H2Bl2FieldsKarkekTKY10459 202LCSS 20418Ku/H2H14FieldsKarkekTKY1045 202LCSS 20418Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY1046 202LCSS 20418Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY1046 202LCSS 20419Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY10408 202LCSS 20419Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16008 2020LCSS 20419Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16008 2020LCSS 20419Brifk Kalls (Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16008 2020LCSS 20420Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16008 2020LCSS 20420Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16008 2020LCSS 20420Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14FieldsKarkekTKY16108 2020LCSS 20421Ku/H2H14Fields <td>F9810</td> <td>臨床検体</td> <td>TKY9810_2020</td> <td>LC553258</td> <td>4/16</td> <td></td> <td>欧州型</td> <td>H10</td> <td></td>	F9810	臨床検体	TKY9810_2020	LC553258	4/16		欧州型	H10	
F1049 売廃除 FXYE01049 LC55310 4/18 F1049 臨床徐 TXY10459_2000 LC553200 4/18 BripRe 整/88 RL412 H14 F1046 臨床徐 TXY10466_2000 LC55320 4/18 BripRe 整/88 RL412 H14 F1048 臨床徐 TXY10468_2000 LC55317 4/19 BripRe 整/88 RL412 H14 F1049 浩貴依 TXY10468_2000 LC55317 4/19 BripRe 整/88 RL412 H14 F1040 浩貴依 TXY10408_2000 LC55317 4/19 BripRe 整/88 RL412 H14 F1051 浩貴依 TXY161031,200 LC55317 4/19 BripRe 整/88 RL412 H14 F1051 浩貴依 TXY161031,200 LC55319 4/19 BripRe 整/88 RL412 H14 F1050 浩貴依 TXY1610512,200 LC55321 4/20 Arbij/k 整/85 RL412 H14 F1050 浩貴依 TXY114/12,200 LC55421 4/21 Arbij/k 董/85 RL412 H14 F1151 浩貴依 TXY114/12,200 LC55421 4/21 Arbij/k 董/85 RL412 H14 F1152 浩貴依 TXY114/14,200 <	F10256	臨床検体	TKY10256_2020	LC553259	4/18		欧州型	H12	
F1049 職業條体 TXY1049_202 LC53204 4/18 成用型 用4 F1046 職席條体 TXY1040_202 LC53261 4/18 B可能集团感染 税用型 114 F1046 職席條体 TXY1040_202 LC53261 4/18 B可能集团感染 税用型 114 F1047 培養体 TXY1040_202 LC5318 4/19 B可能集团感染 税用型 114 F1047 培養体 TXY16040_2020 LC55318 4/19 B可能集团感染 税用型 114 F1051 培養体 TXY16040_2020 LC55518 4/19 B可能集团感染 税用型 114 F1051 培養体 TXY16040_2020 LC55510 4/2 成用型 115 F1050 培養体 TXY161052_2020 LC56520 4/2 A\$P3)農業者人ホーム入居者 既用型 116 F1181 培養体 TXY10142_2020 LC56520 4/2 A\$P3)農業者人ホーム入居者 既用型 116 F1182 培養体 TXY1042_2020 LC56540 4/2 A\$P3)農業者人ホーム人居者 既用型 116	F10419	培養検体	TKYE610419_2020	LC556316	4/18		欧州型	H13	
F1046 職業検修 TXY1040_2020 LC533261 418 B内院電面感快 欧州型 H15 F10466 職業検修 TXY1040_2020 LC55326 418 B内院電面感快 既州型 H14 F10497 培養体 TXY1640_2020 LC556317 419 成州型 H14 F10497 培養体 TXY164097_2020 LC556318 419 B内院電面感快 欧州型 H14 F1040 培養体 TXY164051_2020 LC556318 419 B内院電面感快 欧州型 H14 F1051 培養体 TXY164051_2020 LC55632 420 成州型 H14 F1067 培養体 TXY164051_2020 LC55632 420 成州型 H14 F1084 培養体 TXY1184_2020 LC55632 423 A特列党養老人ホーム入防者 KM型 H18 F1184 培養体 TXY1184_2020 LC55632 423 A特列党養老人ホーム入防者 KM型 H18 F1184 培養体 TXY1184_2020 LC55632 423 A特列党養養法 KM型 H21 F1257 <td>F10459</td> <td>臨床検体</td> <td>TKY10459_2020</td> <td>LC553260</td> <td>4/18</td> <td></td> <td>欧州型</td> <td>H14</td> <td></td>	F10459	臨床検体	TKY10459_2020	LC553260	4/18		欧州型	H14	
F10466 職務條格 TXY1046_2020 LS5326 4/18 B帮院集和感染 限州型 H14 F1048 職務條本 TXY1046_2020 LC55317 4/18 BrŋR集和國家, 限州型 H14 F1050 培養條本 TXYE01050_2020 LC556317 4/19 BrŋR集和國家, 限州型 H14 F1051 培養條本 TXYE01051_2020 LC556319 4/19 BrŋR集和國家, 限州型 H15 F1051 培養條本 TXYE01051_2020 LC55632 4/20 取用集田國家, 限州型 H16 F1050 培養條本 TXYE01050_2020 LC56532 4/20 取用業用運路、 取用型 H16 F1050 培養條本 TXYE10180_2020 LC56547 4/23 A特列費獲老人ホーム入居者 限州型 H18 F1182 培養條本 TXYE1046_2202 LC56474 4/23 A特列費獲老人ホーム入居者 限州型 H19 F1182 培養條本 TXYE1045_22020 LC56474 4/25 取用型 限/型 H19 F1182 培養條本 TXYE1045_22020 LC56414 4/25 取州型 H20 F1182 培養修本 TXYE1045_22020 LC56414	F10461	臨床検体	TKY10461_2020	LC553261	4/18	B病院集団感染	欧州型	H15	
F10468 職康檢修 TKY16048_2020 LS5323 4/18 B病院集団感換 既州型 114 F1049 坊養検修 TKY16049_2020 LS55317 4/19 B病院集団感換 既州型 114 F1050 坊養検修 TKY160109_2020 LS55317 4/19 B病院集団感染 既州型 115 F1051 坊養検修 TKY160105_2020 LC55037 4/19 B病院集団感染 既州型 114 F1050 坊麦検修 TKY160105_2020 LC55037 4/20 成州型 116 F11820 坊麦検修 TKY161050_2020 LC556321 4/20 成州型 118 F11820 坊麦検修 TKY161182_12020 LC556322 4/24 成州型 118 F11840 坊麦検修 TKY16182_20200 LC556424 4/25 取州型 120 F12492 坊麦検修 TKY16182_20200 LC55414 4/25 取州型 121 F12537 坊麦検修 TKY161303_2020 LC56414 4/25 取州型 122 F13137 坊麦検修 TKY161303_2020	F10466	臨床検体	TKY10466_2020	LC553262	4/18	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10497 培養條称 TKYE610497_202 LCS56317 4/19 局南院集团感 欧州型 H14 F10516 培養條称 TKYE610510_2020 LCS56318 4/19 B南院集团感 欧州型 H14 F10513 培養條称 TKYE61051_2020 LCS56319 4/19 B南院集团感 欧州型 H14 F10513 培養條称 TKYE61051_2020 LCS56320 4/20 欧州型 H16 F1053 培養條称 TKYE61067_2020 LCS56321 4/20 K/H型 H16 F1053 培養條称 TKYE61087_2020 LCS56321 4/20 K/H型 H18 F1182 培養條称 TKYE61182_2020 LCS56321 4/23 A特列澳養養之人ホーム入慰者 K/H型 H18 F1182 培養條称 TKY1249_2020 LCS56324 4/25 K/H型 H10 F1242 培養條称 TKY1261327_2020 LCS5614 4/25 K/H型 H10 F1137 培養條称 TKY126137_2020 LCS5612 4/27 B特列獎養養養養 K/H型 H12 F1137 培	F10468	臨床検体	TKY10468_2020	LC553263	4/18	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10504 培養檢称 TKYE610504_2020 LC556318 4/19 B两院集团感染 欧州型 H14 F10513 培養檢称 TKYE61051_2020 LC556319 4/19 B两院集团感染 欧州型 H15 F10513 培養檢称 TKYE61051_2020 LC556320 4/19 B两院集团感染 欧州型 H16 F10830 培養檢称 TKYE610850_2020 LC556321 4/20 欧州型 H15 F11820 培養檢称 TKYE61082_2020 LC556324 4/20 欧州型 H18 F11821 培養檢称 TKYE61182_2020 LC556322 4/23 A种別奠護老人ホーム入居者 欧州型 H19 F1240 培養体 TKYE61182_2020 LC556323 4/24 欧州型 H19 F1241 培養檢称 TKYE61325_2020 LC556410 4/25 欧州型 H20 F12527 培養檢称 TKYE61325_2020 LC556411 4/27 欧州型 H10 F13173 培養檢称 TKYE61317_2020 LC56781 4/17 B特列獎養女人ホーム入居者 欧州型 H23 F14327	F10497	培養検体	TKYE610497_2020	LC556317	4/19		欧州型	H14	
F10510 培養條称 TKYE610510_2020 LCS50319 4/19 B两院集团感染 成州型 H15 F10513 坊養條称 TKYE610510_2020 LCS5030 4/19 B两院集团感染 成州型 H14 F10570 坊養條称 TKYE610850_2020 LCS56321 4/20 成州型 H15 F11820 坊麦條称 TKYE611820_2020 LCS56321 4/20 成州型 H18 F11820 坊麦條称 TKYE611820_2020 LCS56322 4/23 A种別東護老人ホーム入居者 限州型 H18 F11840 坊麦條称 TKYVE1942_2020 LCS56323 4/24 成州型 H19 F1242 坊麦條称 TKYVE1042_2020 LCS6410 4/25 成州型 H12 F12551 坊麦條称 TKYE61035_2020 LCS6411 4/25 成州型 H12 F1255 坊麦條称 TKYE61035_2020 LCS6414 4/27 B特別集護老人ホーム入居者 欧州型 H23 F1373 坊麦條称 TKYE61375_2020 LCS6753 5/3 欧州型 H24 F14375 坊麦條称 <t< td=""><td>F10504</td><td>培養検体</td><td>TKYE610504_2020</td><td>LC556318</td><td>4/19</td><td>B病院集団感染</td><td>欧州型</td><td>H14</td><td></td></t<>	F10504	培養検体	TKYE610504_2020	LC556318	4/19	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10513 培養條称 TKYE610513_2020 LC572067 4/19 B····································	F10510	培養検体	TKYE610510_2020	LC556319	4/19	B病院集団感染	欧州型	H15	
F10670 培養條称 TKYE010670_2020 LC556320 4/20 取州型 H10 F10820 培養條称 TKYE01080_2020 LC556321 4/20 取州型 H15 F11820 培養條称 TKYE61182_02020 LC556321 4/23 A特別養護老人ホーム入居者 取州型 H18 F11821 培養條称 TKYVE1194_2020 LC556323 4/24 取州型 H19 F1242 培養條称 TKYVE1292_2020 LC565433 4/24 取州型 H20 F12531 培養條称 TKYVE1292_2020 LC565410 4/25 取州型 H10 F12531 培養條称 TKYVE10527_2020 LC565410 4/27 取州型 H10 F13035 培養條称 TKYVE16137_2020 LC565411 4/27 B特別奧護老人ホーム入居者 取州型 H22 F13035 培養條称 TKYVE1042_27_2020 LC565414 4/27 B特別奧護老人ホーム入居者 取州型 H23 F14375 培養條称 TKYE6137_2020 LC567815 5/1 C病院集団感 取州型 H23 F14327 培養條称 <td>F10513</td> <td>培養検体</td> <td>TKYE610513_2020</td> <td>LC572067</td> <td>4/19</td> <td>B病院集団感染</td> <td>欧州型</td> <td>H14</td> <td></td>	F10513	培養検体	TKYE610513_2020	LC572067	4/19	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10850 培養桃林 TKYE610850_2020 LC556321 4/20 政州型 H15 F11820 培養桃林 TKYE61182_0202 LC565407 4/23 A特別樂護老人ホーム入居者 阪州型 H18 F11820 培養桃林 TKYE61182_0200 LC565022 4/23 A特別樂護老人ホーム入居者 欧州型 H18 F11964 培養桃林 TKYV1194/2020 LC565223 4/24 欧州型 H19 F12492 培養桃林 TKYV11249_2020 LC565323 4/24 吸州型 H20 F12527 培養桃林 TKYV12492_200 LC565410 4/25 欧州型 H10 F12581 培養桃林 TKYV1269_2020 LC565411 4/25 欧州型 H10 F1373 培養桃林 TKYE61373_2020 LC565412 4/27 B特別樂護老人ホーム入居者 欧州型 H23 F1373 培養桃林 TKYE61373_2020 LC565414 4/27 B特別集護老人ホーム入居者 欧州型 H24 F1482 培養桃林 TKYE61473_2020 LC567853 5/1 C 欧州型 H25 F1482 培養桃林 TKYE61486_2020 LC567855 5/3 欧州型 H25 <	F10670	培養検体	TKYE610670_2020	LC556320	4/20		欧州型	H10	
F11820培養桃本TKYE611820_2020LCS654074/23A特別樂護老人ホーム入居者欧州型H18F11821培養桃本TKYE611821_2020LCS654084/23A特別樂護老人ホーム入居者欧州型H18F11940培養桃本TKYV11494_2020LCS653234/24欧州型H19F12492培養桃本TKYV12492_2020LCS654094/25欧州型H20F12531培養桃本TKYV1269_2020LCS654104/25欧州型H10F12689培養桃本TKYV61269_2020LCS654114/25欧州型H10F1373培養桃本TKYV61373_2020LCS654144/27B特別集護老人ホーム入居者欧州型H24F1375培養桃本TKYF61375_2020LCS654144/27B特別集護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養桃本TKYF61375_2020LCS678144/27B特別集護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養桃本TKYF61437_2020LCS678515/1C病院集団感染欧州型H26F14866培養桃本TKYF61437_2020LCS678555/3欧州型H27F14866培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/3欧州型H28F15178培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/3欧州型H29F1520培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/7欧州型H29F1520培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/7欧州型H29F1521培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/7欧州型H30F1520培養桃本TKYF615721_2020LCS678555/7欧州型<	F10850	培養検体	TKYE610850_2020	LC556321	4/20		欧州型	H15	
F11821 培養條称 TKYE611821_2020 LC565408 4/23 A特別樂護老人ホーム入居者 欧州型 H18 F11964 培養條称 TKYV11964_2020 LC556322 4/23 欧州型 H19 F12492 培養條称 TKYV12080_2002 LC556323 4/24 欧州型 H20 F12551 培養條称 TKYVE61257_2020 LC565410 4/25 欧州型 H10 F12551 培養條称 TKYVE1082_0202 LC565411 4/25 欧州型 H10 F13035 培養條称 TKYE61357_2020 LC565414 4/27 B特別樂護老人ホーム入居者 欧州型 H23 F13173 培養條称 TKYE613175_2020 LC565414 4/27 B特別樂護老人ホーム入居者 欧州型 H24 F14327 培養條称 TKYE61375_2020 LC567851 5/1 C俯院集団感染 欧州型 H26 F1482 培養條称 TKYE61490_2020 LC567855 5/3 欧州型 H27 F1486 培養條称 TKYE61496_2020 LC567855 5/3 欧州型 H28 F1521 培養條称 TKYE61517_02020 LC567855 5/3 欧州型 H28 F152	F11820	培養検体	TKYE611820_2020	LC565407	4/23	A特別養護老人ホーム入居者	欧州型	H18	
F11964 培養檢称 TKYV11964_020 LC556322 4/23 取州型 H19 F12492 培養檢称 TKYV1249_2020 LC556323 4/24 取州型 H20 F1257 培養檢称 TKYE612527_2020 LC565409 4/25 取州型 H10 F12680 培養檢称 TKYE61253_0200 LC565410 4/25 取州型 H22 F13035 培養檢称 TKYE61317_0200 LC565412 4/27 B特別養護老人ホーム入歴者 取州型 H23 F13175 培養檢称 TKYE613175_020 LC56781 4/27 B特別養護老人ホーム入歴者 取州型 H24 F14327 培養檢称 TKYE614327_020 LC56781 5/1 C病院集団感唤 欧州型 H26 F14462 培養檢称 TKYE61486_0202 LC567853 5/3 取州型 H26 F14464 培養檢称 TKYE61486_0202 LC567850 5/3 取州型 H28 F15178 培養檢称 TKYE61490_2020 LC567850 5/3 取州型 H28 F15178 培養檢称 TKYE61490_2020 LC567856 5/7 取州型 H28 F1518 培養檢称 <t< td=""><td>F11821</td><td>培養検体</td><td>TKYE611821_2020</td><td>LC565408</td><td>4/23</td><td>A特別養護老人ホーム入居者</td><td>欧州型</td><td>H18</td><td></td></t<>	F11821	培養検体	TKYE611821_2020	LC565408	4/23	A特別養護老人ホーム入居者	欧州型	H18	
F12492培養検林TKYV12492_2020LC5563234/24欧州型H20F12527培養検林TKYE612527_2020LC564094/25欧州型H21F12551培養検林TKYE61251_2020LC5654104/25欧州型H10F12689培養検林TKYE61305_2020LC5654124/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H22F13173培養検林TKYE613173_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13173培養検林TKYE613173_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養検林TKYE614372_2020LC5678515/1C/雨院集団感染欧州型H26F14862培養検林TKYE614862_2020LC5678555/3欧州型H27F14864指装検林TKYE614862_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養検林TKYE614860_2020LC5678555/3欧州型H28F15202培養検林TKYE615178_2020LC5678555/7欧州型H30F15202培養検林TKYE61521_2020LC5678565/7欧州型H31F15406培養検林TKYE61540_2020LC5678455/7欧州型H31F15406培養検林TKYE61544_2020LC5678455/7欧州型H28F15406培養検林TKYE61544_2020LC5678455/7K州型H28F15406培養検林TKYE615442_020LC5678455/7K州型H28F15406培養検林TKYE615442_020LC5678455/7K州型H28F15404<	F11964	培養検体	TKYV11964_2020	LC556322	4/23		欧州型	H19	
F12527培養檢体TKYE61257_2020LC5654094/25欧州型H21F12551培養檢体TKYE612551_2020LC5654104/25欧州型H10F12689培養檢体TKYV12689_2020LC5654114/25欧州型H10F13035培養檢体TKYE613035_2020LC5654124/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H10F13173培養檢体TKYE613173_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13173培養檢体TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養檢体TKYE614327_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養檢体TKYE61486_2020LC5678555/3K州型H25F14866培養檢体TKYE614903_2020LC5678555/3K州型H28F15178培養檢体TKYE615178_2020LC5678545/6家族内感染(15221と同家族)K州型H30F15220培養檢体TKYE61540_2020LC5678545/6家族内感染(15221と同家族)K州型H30F15406培養檢体TKYE61540_2020LC5678545/7K州型H31F15419培養檢体TKYE61540_2020LC5678465/7K州型H32F15464培養檢体TKYE615419_2020LC5678465/7K州型H32F15464指養檢体TKYE615419_2020LC5678465/7K州型H32F15444培養檢体TKYE615419_2020LC5678465/7K州型H32F15444市養檢体TKYE615419_2020LC5678465/8C病院集団感染 <td< td=""><td>F12492</td><td>培養検体</td><td>TKYV12492_2020</td><td>LC556323</td><td>4/24</td><td></td><td>欧州型</td><td>H20</td><td></td></td<>	F12492	培養検体	TKYV12492_2020	LC556323	4/24		欧州型	H20	
F12551培養條林TKYE612551_2020LC5654104/25欧州型H10F12689培養條林TKYY12689_2020LC5654114/25欧州型H22F13035培養條林TKYE613035_2020LC5654124/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13173培養條林TKYE613175_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養條林TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養條体TKYE614862_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養條体TKYE614862_2020LC5678555/3欧州型H28F15220培養條体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15221培養條体TKYE615178_2020LC5678545/6家族内感染(15221と同家族)既州型H30F15406培養條体TKYE61540_2020LC5678565/7取州型H31F15419培養條体TKYE615419_2020LC5678455/7K州型H31F15419培養條体TKYE61544_2020LC5678455/7K州型H32F15464培養條体TKYE61564_2020LC5678455/7K州型H32F15464培養條体TKYE61566_2020LC5678455/7K州型H32F15464培養條体TKYE61566_2020LC5678455/7K州型H32F15464培養條体TKYE61566_2020LC5678455/8K/州型H32F15464培養條体TKYE61566_2020LC5678455/8K//K//F15667 <td>F12527</td> <td>培養検体</td> <td>TKYE612527_2020</td> <td>LC565409</td> <td>4/25</td> <td></td> <td>欧州型</td> <td>H21</td> <td></td>	F12527	培養検体	TKYE612527_2020	LC565409	4/25		欧州型	H21	
F12689培養檢称TKYV12689_2020LC5654114/25欧州型H22F13035培養檢称TKYE613035_2020LC5654124/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H10F13173培養檢称TKYE613173_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13175培養檢称TKYE613175_2020LC5678115/1C病院集団感染欧州型H26F14327培養檢称TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養檢称TKYE61486_2020LC5678595/3欧州型H25F14903培養檢称TKYE615178_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養檢称TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15220培養檢称TKYE615178_2020LC5678535/6家族内感染 (15221と同家族)既州型H29F15221培養檢称TKYE61540_2020LC5678545/6家族内感染 (15220と同家族)既州型H31F15419培養檢称TKYE615419_2020LC5678455/7K州型H32F15484培養檢称TKYE61544_2020LC5678455/7K州型H32F15484培養檢称TKYE61544_2020LC5678455/7K州型H32F15484培養檢称TKYE61564_2020LC5678455/7K州型H32F15484培養檢称TKYE615645_2020LC5678455/7K州型H32F15484培養檢称TKYE615661_2020LC5678455/8C病院集団感染K州型H32F15484培養檢称TKYE615667_2020LC567845 <td>F12551</td> <td>培養検体</td> <td>TKYE612551_2020</td> <td>LC565410</td> <td>4/25</td> <td></td> <td>欧州型</td> <td>H10</td> <td></td>	F12551	培養検体	TKYE612551_2020	LC565410	4/25		欧州型	H10	
F13035培養検体TKYE613035_2020LC5654124/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H10F13173培養検体TKYE613173_2020LC5563244/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13175培養検体TKYE613175_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養検体TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養検体TKYE61486_2020LC5678525/3欧州型H25F14866培養検体TKYE61486_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養検体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15220培養検体TKYE61520_2020LC5678535/6家族内感染 (15221と同家族)欧州型H29F15221培養検体TKYE615406_2020LC5678565/7欧州型H30F15406培養検体TKYE615419_2020LC5678565/7欧州型H31F15419培養検体TKYE615419_2020LC5678455/7欧州型H32F15484培養検体TKYE61544_2020LC5678455/7欧州型H32F15667培養検体TKYE61564_2020LC5678465/7欧州型H25F15667培養検体TKYE61566_2020LC5678485/8Cη院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKYE61566_2020LC5678485/8Cη院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKYE61566_2020LC5678455/3欧州型H25F15667培養検体TKYE61566_2020LC5678485/	F12689	培養検体	TKYV12689_2020	LC565411	4/25		欧州型	H22	
F13173培養検体TKYE613173_2020LC5563244/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H23F13175培養検体TKYE613175_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養検体TKYE613327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養検体TKYE61486_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養検体TKYE61486_2020LC5678555/3欧州型H25F14903培養検体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15178培養検体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15220培養検体TKYE61521_2020LC5678555/6家族内感染(15221と同家族)欧州型H29F15221培養検体TKYE615406_2020LC5678565/7欧州型H31F15406培養検体TKYE615419_2020LC5678455/7欧州型H32F15464培養検体TKYE61544_2020LC5678455/7欧州型H25F15667培養検体TKYE61564_2020LC5678455/7欧州型H25F15667培養検体TKYE61564_2020LC5678455/8Cη院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKYE61566_2020LC5678455/8Cη院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKY1873_2020LC5678575/30欧州型H33F17904臨床検体TKY1904_2020LC5678585/30阿州型H34	F13035	培養検体	TKYE613035_2020	LC565412	4/27		欧州型	H10	
F13175培養検体TKYE613175_2020LC5654144/27B特別養護老人ホーム入居者欧州型H24F14327培養検体TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養検体TKYE61486_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養検体TKYE61486_2020LC5678495/3欧州型H25F14903培養検体TKYE614903_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養検体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F15220培養検体TKYE61520_2020LC5678535/6家族内感染 (15221 と同家族)欧州型H29F15221培養検体TKYE61502_0200LC5678565/7欧州型H30F15406培養検体TKYE615419_2020LC5678565/7欧州型H32F15419培養検体TKYE615419_2020LC5678455/7欧州型H32F15464培養検体TKYE61544_2020LC5678465/7欧州型H25F15667培養検体TKYE61564_2020LC5678475/8Cη院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKY161566_2020LC5678485/3欧州型H25F17873臨床検体TKY17873_2020LC5678575/30欧州型H33F17904臨床検体TKY17904_2020LC5678585/30欧州型H34	F13173	培養検体	TKYE613173_2020	LC556324	4/27	B特別養護老人ホーム入居者	欧州型	H23	
F14327培養検体TKYE614327_2020LC5678515/1C病院集団感染欧州型H26F14862培養検体TKYE614862_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養検体TKYE614866_2020LC5678495/3欧州型H25F14903培養検体TKYE614903_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養検体TKYE615178_2020LC5678505/5欧州型H28F1520培養検体TKYE61521_2020LC5678535/6家族内感染 (15221と同家族)欧州型H29F1521培養検体TKYE61521_2020LC5678565/7欧州型H30F15406培養検体TKYE615406_2020LC5678565/7欧州型H31F15419培養検体TKYE615419_2020LC5678465/7欧州型H28F15664培養検体TKYE61564_2020LC5678455/8C病院集団感染欧州型H25F15667培養検体TKY1873_2020LC5678575/30欧州型H33F17904臨床検体TKY17904_2020LC5678585/30D欧州型H34	F13175	培養検体	TKYE613175_2020	LC565414	4/27	B特別養護老人ホーム入居者	欧州型	H24	
F14862培養検体TKYE614862_2020LC5678525/3欧州型H27F14866培養検体TKYE614866_2020LC5678495/3欧州型H25F14903培養検体TKYE614903_2020LC5678555/3欧州型H28F15178培養検体TKYE615178_2020LC5678535/6家族内感染 (15221 と 同家族)欧州型H29F15220培養検体TKYE61521_2020LC5678545/6家族内感染 (15220 と 同家族)欧州型H30F1521培養検体TKYE615406_2020LC5678565/7欧州型H31F15406培養検体TKYE615419_2020LC5678455/7欧州型H32F15444培養検体TKYE61544_2020LC5678465/7欧州型H25F15667培養検体TKYE61564_2020LC5678475/8C/fick集団感染欧州型H25F17873臨床検体TKY17873_2020LC5678575/30欧州型H33F17904臨床検体TKY17904_2020LC5678585/30D/fick集団感染欧州型H34	F14327	培養検体	TKYE614327_2020	LC567851	5/1	C病院集団感染	欧州型	H26	
F14866 培養検体 TKYE614866_2020 LC567849 5/3 欧州型 H25 F14903 培養検体 TKYE614903_2020 LC567855 5/3 欧州型 H28 F15178 培養検体 TKYE615178_2020 LC567850 5/5 欧州型 H28 F15178 培養検体 TKYE61520_2020 LC567853 5/6 家族内感染 (15221 と同家族) 欧州型 H29 F15221 培養検体 TKYE61521_2020 LC567854 5/6 家族内感染 (15220 と同家族) 欧州型 H30 F15406 培養検体 TKYE615406_2020 LC567856 5/7 欧州型 H32 F15419 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15464 培養検体 TKYE61544_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15464 培養検体 TKYE61564_2020 LC567847 5/8 C//// S/// S/// S/// S/// S/// S/// S//	F14862	培養検体	TKYE614862_2020	LC567852	5/3		欧州型	H27	
F14903 培養検体 TKYE614903_2020 LC567855 5/3 欧州型 H28 F15178 培養検体 TKYE615178_2020 LC567850 5/5 欧州型 H28 F15178 培養検体 TKYE615178_2020 LC567850 5/5 欧州型 H29 F1520 培養検体 TKYE61521_2020 LC567853 5/6 家族内感染 (15221と同家族) 欧州型 H30 F1521 培養検体 TKYE61521_2020 LC567856 5/7 欧州型 H31 F15406 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15419 培養検体 TKYE615440_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F1564 培養検体 TKYE61544_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34 >	F14866	培養検体	TKYE614866 2020	LC567849	5/3		欧州型	H25	
F15178 培養検体 TKYE615178_2020 LC567850 5/5 欧州型 H28 F15220 培養検体 TKYE61520_2020 LC567853 5/6 家族内感染 (15221 と同家族) 欧州型 H29 F15221 培養検体 TKYE61521_2020 LC567854 5/6 家族内感染 (15220 と同家族) 欧州型 H30 F1520 培養検体 TKYE61502_0200 LC567856 5/7 欧州型 H31 F15406 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15448 培養検体 TKYE61544_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE61564_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F14903	培養検体	TKYE614903_2020	LC567855	5/3		欧州型	H28	
F15220 培養検体 TKYE61522_0200 LC567853 5/6 家族内感染(15221と同家族) 欧州型 H29 F1521 培養検体 TKYE61521_2020 LC567854 5/6 家族内感染(15220と同家族) 欧州型 H30 F1520 培養検体 TKYE61520_2020 LC567856 5/7 欧州型 H31 F15406 培養検体 TKYE615406_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15419 培養検体 TKYE61544_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE61564_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE61566_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15178	培養検体	TKYE615178_2020	LC567850	5/5		欧州型	H28	
F15221 培養検体 TKYE615221_2020 LC567854 5/6 家族内感染(1520と同家族) 欧州型 H30 F15406 培養検体 TKYE615406_2020 LC567856 5/7 欧州型 H31 F15419 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15484 培養検体 TKYE61544_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE61564_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15220	培養検体	TKYE615220_2020	LC567853	5/6	家族内感染(15221と同家族)	欧州型	H29	
F15406 培養検体 TKYE615406_2020 LC567856 5/7 欧州型 H31 F15419 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15484 培養検体 TKYE615442_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE61564_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15221	培養検体	TKYE615221_2020	LC567854	5/6	家族内感染(15220と同家族)	欧州型	H30	
F15419 培養検体 TKYE615419_2020 LC567845 5/7 欧州型 H32 F15484 培養検体 TKYE615484_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE615664_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15406	培養検体		LC567856	5/7		欧州型	H31	
F15484 培養検体 TKYE615484_2020 LC567846 5/7 欧州型 H28 F15664 培養検体 TKYE615664_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15419	培養検体	TKYE615419_2020	LC567845	5/7		欧州型	H32	
F15664 培養検体 TKYE615664_2020 LC567847 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15484	培養検体		LC567846	5/7		欧州型	H28	
F15667 培養検体 TKYE615667_2020 LC567848 5/8 C病院集団感染 欧州型 H25 F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15664	培養検体		LC567847	5/8	C病院集団感染	欧州型	H25	
F17873 臨床検体 TKY17873_2020 LC567857 5/30 欧州型 H33 F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集団感染 欧州型 H34	F15667	培養検体		LC567848	5/8	C病院集団感染	欧州型	H25	
F17904 臨床検体 TKY17904_2020 LC567858 5/30 D病院集团感染 欧州型 H34	F17873	臨床検体	TKY17873 2020	LC567857	5/30		欧州型	H33	
	F17904	臨床検体	TKY17904 2020	LC567858	5/30	D病院集団感染	欧州型	H34	
F17926 臨床檢体 TKY17926_2020 LC567859 5/30 D病院集团感染 欧州型 H34	F17926	臨床検体	TKY17926 2020	LC567859	5/30	D病院集団感染	欧州型	H34	



図 1. SARS-CoV-2 全長配列の系統樹解析



図 2. SARS-CoV-2 のハプロタイプネットワーク図 () 内の数字は塩基の相違数を示す.

表4. SARS-CoV-2全長配列解析で認められた変異

領域	位置	変異	株数	領域	位置	変異	株数
5 UTR	241	$C \rightarrow T$	42		21600	$G \rightarrow T$	2
	313	$C \rightarrow T$	37		21846	$C \rightarrow T$	1
	1322	$G{\rightarrow} T$	1		22482	$C \rightarrow T$	1
	1907	T→G	2		22991	A→G	1
	1965	$T \rightarrow C$	1		23077	$C \rightarrow T$	1
	1997	$C \rightarrow T$	1	S	23185	$C \rightarrow T$	7
	2824	$T{\rightarrow}C$	1		23403	A→G	42
	3037	$C { ightarrow} T$	42		24106	$C \rightarrow T$	1
	3136	$T{\rightarrow}C$	3		24621	C→A	1
	3990	$C { ightarrow} T$	2		25177	$G \rightarrow T$	1
	4006	$G \rightarrow T$	4		25218	$G \rightarrow T$	4
	4346	$T \rightarrow C$	1		25498	$C \rightarrow T$	1
	4402	$T \rightarrow C$	1		25521	$C \rightarrow T$	1
	4456	$C \rightarrow T$	2		25563	G→C	1
	5062	$G \rightarrow T$	1	ORF3a	25665	$C \rightarrow T$	12
	6190	$C {\rightarrow} T$	2		25677	$G \rightarrow T$	1
	6336	$C \rightarrow T$	3		25855	$G \rightarrow T$	4
	6633	$C \rightarrow T$	4		26111	$C \rightarrow T$	1
	8782	$C \rightarrow T$	2		26301	T→G	1
	9286	$C \rightarrow T$	1	E	26447	$C \rightarrow T$	8
	10376	$C \rightarrow T$	1		26730	G→A	2
	10471	A→G	2	М	26840	G→A	2
	11081	G→A	2		26966	T→A	1
ORF1ab	11083	G→T	2		27503	C→T	1
	11752	$C \rightarrow T$	12		27668	del	6
	12025	$C \rightarrow T$	1	ORF7a	27669	del	6
	12374	$C \rightarrow T$	1		27700	del	6
	12571	A→G	2		27700	A→G	6
	12778	$C \rightarrow T$	2		28144	T→C	2
	13356	$C \rightarrow T$	1	ORF8	28178	G→T	1
	14074	C→A	3		28253	$C \rightarrow T$	1
	14348	A→G	2		28300	G→T	1
	14408	$C \rightarrow T$	43		28725	$C \rightarrow T$	1
	14708	$C \rightarrow T$	1		28881	G→A	41
	15848	$C \rightarrow T$	2		28882	G→A	41
	15939	$T \rightarrow C$	2	N	28883	G→C	41
	15951	$C \rightarrow T$	1		28912	T→C	12
	16338	$C \rightarrow T$	1		28975	$G \rightarrow T$	11
	16744	G→A	1		29550	$C \rightarrow T$	1
	17245	$C \rightarrow T$	1	ORF10	29635	$C \rightarrow T$	1
	18756	$G \rightarrow T$	2		29692	$G \rightarrow T$	1
	19221	T→C	1		29733	$C { ightarrow} T$	1
	20134	$G { ightarrow} T$	1		29742	$G { ightarrow} T$	1
	20268	A→G	1	3'UTR	29751	G→C	1
	20476	$G {\rightarrow} T$	1	, o m	29764	$G { ightarrow} T$	8
	20762	$C { ightarrow} T$	1				
	21190	G→A	1				

4. ハプロタイプネットワーク解析

全長を取得した全58株および1件の参照配列を合わせた 計59株のハプロタイプネットワーク解析の結果,全長を 取得した58株からは34種類(H1~H34)の異なるハプロタ イプが見つかった(図2).この34種類のハプロタイプの 大部分は出現頻度が低く,1株だけで検出されたものは24 種類で全体の71%を占めた.これら全34種類のハプロタ イプネットワーク図(図2)では系統樹解析と同様に大き く2つの系統に分かれた(武漢型:参照株およびH1~ H7,欧州型:H8~H34).武漢型は参照配列を含む2月 から3月下旬に搬入された検体由来のものであり,欧州型 は4月から5月に搬入されたすべての検体で構成されてい た.武漢型は参照株を,欧州型はH10のハプロタイプを中 心としたハプロタイプネットワークを形成していた.また,参照配列を含む全59株と各系統のハプロタイプ多様 度は0.779~0.962と高い一方,塩基多様度は0.00014~ 0.00030と低かった.また,各系統および全株のTajima's Dは負の値を示した(表5).

表5. 系統群の遺伝的多様性

	株数	ハプロタイプ数	ハプロタイプ多様度 (<i>h</i> =)	塩基多様度 (π=)	Tajima's D
武漢型	17	8	0.779	0.00014	-0.88864
欧州型	42	27	0.962	0.00019	-2.31144**
全株	59	35	0.963	0.00030	-1.81198*
				* p< 0.05	** p< 0.01

察

老

今回、RNAからのNGS解析により,患者臨床検体から 分離培養した株の全てからほぼ全長の塩基配列を取得する ことができた.しかし,臨床検体全体では,全長取得の成 功率は3割ほどであった.アセンブリの評価からも,分離 培養株と臨床検体とでは大きく異なっていた.臨床検体の N50や平均Contig長,最大Contig長は分離培養株より低い 一方,Contig数は多かったことから不完全なContigが多く 含まれていると考えられる.臨床検体から全長配列を取得 するには検体中のRNA量が重要であり,その際,リアル タイムPCR法でのCt値が目安になるとの報告がある¹²⁾.そ こで,今回,主にCt値が20サイクル以下の検体を解析に用 いたが,RNAからの直接的なNGS解析では全長を得るこ とが難しく,Ct値は目安にはなるものの,臨床検体から直 接RNAを解析する方法についてはさらに検討が必要であ る.

同一検体において、分離培養株でのみ確認された混合塩 基は、臨床検体ではCoverageが少ないため、混合塩基を検 出できなかった可能性も否定できないが、Vero系細胞を用 いて継代していく過程で生じた変異である可能性も考えら れた12). 培養細胞でウイルスを複製する際に生じる塩基置 換の頻度は、ウイルスの潜在的な変異特性を把握するうえ で重要であると考えられる. コロナウイルスは一本鎖 RNAウイルスである. 一般的にRNAウイルスは変異が生 じやすいことが知られているが、エキソヌクレアーゼ活性 があり修復システムを有するため、RNAウイルスのなか では変異がおこりにくいと考えられる.今回,解析した検 体すべてに参照株とは違う変異が確認された.また、A病 院集団感染事例で検出された6検体では、ORF7a領域に3塩 基の欠失が存在する株も確認された. ORF7a領域における この欠失によるウイルスの増殖への影響は不明であり、変 異によりウイルスの感染性や病原性が変化する可能性があ る.また、変異により抗原性が変化し、ワクチンの有効性 に影響する可能性もある.そのため、新たな変異の出現を 今後も監視し、検証する必要がある.

今回のSARS-CoV-2の系統樹解析において,集団発生事 例の各患者間の塩基配列はほぼ同一になり,クラスターを 形成した.当初,F15419の患者は,集団感染事例のあっ たA病院での感染が疑われたが、患者がA病院を訪れてか ら発症までに1か月以上あった.また、患者から得られた 配列の系統樹解析では、A病院の集団発生時の患者由来株 とF15419患者由来株は同一クラスターに分類されなかっ たことから(図1), A病院のクラスターの原因ではなか ったと考えられた. このように系統樹解析により関連する 事例を推定することができ,感染経路の推定に分子系統解 析が有用であると考えられた.また、今回の系統樹解析に おいて、大きく2つの系統に分類することができたが、2つ の系統はスパイク領域の変異と関連した13).1つは中国武 漢で初めて報告された参照株と同じ系統である「武漢型」 である. 「武漢型」はクルーズ船ダイヤモンドプリンセス 号関連など2月から3月下旬まで検出されたが、その後は検 出されなかった.代わって3月中旬以降から検出された SARS-CoV-2は, A23403Gの変異を有し, この変異はスパ イク領域にD614Gのアミノ酸の変化を伴う「欧州型」であ る14).スパイク領域は宿主細胞に結合して侵入する部位で あり、ウイルスの感染力や毒性に大きく関係すると考えら れている.

ハプロタイプネットワーク解析においても、大きく2つ の系統に分かれた(図2).特に4月から5月に搬入された 欧州型の検体で構成されるハプロタイプネットワークの特 徴として、中央に祖先型となるハプロタイプ(H10)が位 置し、祖先型から子孫型が放射状に分岐する「一斉放散」 が見られた.また、ハプロタイプ多様度は非常に高い一 方、塩基多様度は低い値となった.これは集団の急激な減 少(ボトルネック)が起きたと考えられる.さらに Tajima's Dが有意な負の値を示したことから(表5)、欧 州型に分類される株が急激に増加していることが示唆され た.

以上の系統樹解析およびハプロタイプネットワーク解析 より、2月から3月下旬にかけては「武漢型」の感染によ るものであったが、その後、欧米への渡航自粛が始まる3 月中旬までに海外からの帰国者経由による「欧州型」によ る感染拡大が3月下旬以降に広がったと考えられる.

SARS-CoV-2は特に若年層において無症状の不顕性感 染や軽症の場合が多く、感染の自覚のないまま新たな感染 源となってしまう例が明らかになってきている.このよう な「感染経路不明」となる感染例の経路の解明にゲノム解 析は有効であると考えられ、変異をたどることにより、感 染の広がり方の追跡が可能となることが示唆された.

今後もデータを継続的に解析・蓄積していくことで、東 京都内に拡散するSARS-CoV-2の実態把握が可能になるも のと思われる.

まとめ

2020年2月1日から5月31日までに新型コロナウイルス感 染症が疑われて搬入された検体で、リアルタイムPCR法で 陽性となった検体中のSARS-CoV-2をNGSで全長の塩基配 列を取得し、解析した. SARS-CoV-2の全長配列の解析に はVero系細胞を用いた分離培養株が有用であった.また, 分離培養株では一部に臨床検体では見られない混合塩基が 認められた.都内で検出されたSARS-CoV-2の全長の系統 樹解析の結果,集団発生事例では同一クラスターに,全体 では「武漢型」と「欧州型」の2つの系統に分類された. さらに,ハプロタイプネットワーク解析より,2020年3月 から4月にかけて東京都内で感染拡大し,流行したSARS-CoV-2は3月中旬に欧州から帰国者がもたらした「欧州 型」によるものであることが推察された.

文 献

- 東京都福祉保健局:新型コロナウイルスに関連した 感染症の患者の発生について、令和2年1月24日. https://www.metro.tokyo.lg.jp/tosei/hodohappyo/press/20 20/01/24/20.html (2020 年7 月15 日現在、なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 東京都福祉保健局:新型コロナウイルスに関連した 感染症の患者の発生について(第14報),令和2年2 月14日.
 https://www.bousai.metro.tokyo.lg.jp/taisaku/saigai/10072
 61/1007327.html (2020 年7 月15 日現在,なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- Yu, WB., Tang, GD., Zhang, L, et al. : Zoological Research, 41 (3), 247–257, 2020.
- Xiaolu, T., Changcheng, W., Xiang, L., et al.; National Science Review, 7: 1012–1023, 2020.
- Forster, P., Forster, L., Renfrew, C., *et al.* : *PNAS*. 117 (17), 9241-9243, 2020.
- Gudbjartsson, D, F., Helgason, A., Jonsson, H., *et al.* : N Engl J Med, 382, 2302-2315, 2020.
- 7) Nextstrain: https://nextstrain.org/narratives/ncov/sit-rep/ja/2020-03-20 (2020 年7 月15 日現在, なお本URL は変更または 抹消の可能性がある)
- Nagashima, M. Kumagai, R. Yoshida, I., et al.: JJID, 73, 320-322, 2020.
- Shirato, K., Nao, N., Katano, H., et al. : JJID, 73, 304-307, 2020.
- 10) Leigh, JW, Bryant D: Ecol Evol, 6 (9):1110-1116, 2015.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., *et al*, : *Mol. Biol. Evol*, **34**: 3299-3302, 2017.
- 12) 齊木 大,日向綾子,千葉隆司,他:東京健安研セ年 報,68,55-59,2017.
- Korber, B., Fischer, WM., Gnanakaran, S., et al. : bioRxiv. 2020.
- 14) Koyama, T., Weeraratne, D., Snowdon, J, L., *et al.* : *Pathogens*, **9** (5), 324, 2020.

Genetic analysis of SARS-CoV-2 detected in Tokyo using Next Generation Sequencer(NGS) (Februry 2020 to May 2020)

Hiroyuki ASAKURA^a, Mami NAGASHIMA^a, Ryota KUMAGAI^a, Isao Yoshida^a, Noeru HASEGAWA^a, Michiya HASEGAWA^a, Takushi FUJIWARA^a, Masaki HAYASHI^a, Miyuki NAGANO^a, Takako YAMAZAKI^a, Mamiyo KAWAKAMI^a, Yuire KITAMURA^a, Emiko KAKU^a, Yu YAOITA^a, Kohji MORI^a, Yuta UCHIDA^a, Sachiko HARADA^a, Ai SUZUKI^a, Fumi KASUYA^a, Tomohiro KOSUGI^a, Yukinao HAYASHI^a, Takashi CHIBA^a, and Kenji SADAMASU^a

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), initially labelled as 2019-nCoV, is a coronavirus that causes the novel coronavirus infection (COVID-19). Since its first outbreak in Tokyo on January 2020, its spread has continued intermittently. In this paper, we report the full-length sequences of SARS-CoV-2 detected in Tokyo from February to May 2020 that were obtained using a next-generation sequencer (NGS) and subsequently analyzed. As a result, from February to late March 2020, a "Wuhan type " SARS-CoV-2 similar to the strain reported in Wuhan in the early stages of the outbreak was detected. However, after late March, the "Wuhan type" was no longer detected, and a "European type" SARS-CoV-2 with the D614G mutation started turning up. From the above results, it is thought that the spread of COVID-19, which had spread in Tokyo from March to April 2020 at epidemic levels, was due to the "European type" SARS-CoV-2 introduced by returning travelers from Europe in late March.

Keywords: 2019-nCoV, SARS-CoV-2, COVID-19, NGS

 ^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan