

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, 加来 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⁷⁾。

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°C15分で酵素の失活を行った後に, 94°C15秒, 60°C1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

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
^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
^c 東京都健康安全研究センター微生物部

orf1ab-13215-F/orf1ab-13257-R, orf1ab-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) を用いてコンテイングを作成し, 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)
F938	臨床	19.7/20.3	320	486	497	3303
	培養		37	3919	1287	8545
F968	臨床	16.1/16.0	269	528	512	3005
	培養		82	1720	964	29832
F3319	臨床	16.6/13.8	284	481	489	3913
	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
F4688	臨床	20.2/16.9	195	433	438	1756
	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
F938	17107	C or T	T	T
	26333	C or T	C	C
F968	3814	C or T	T	T
	23525	C or T	C	C
F3319	886	C or T	C or T	T
	16564	G or T	G	G
F3738	6194	C or T	C or T	C
	8602	A or G	G	G
	9533	A or T	A	A
	15942	A or G	A	A
	20055	A or G	A	A
	22088	C or T	C or T	C
	F3751	17576	A or C	A
21835		T or C	T	T
F10670	21691	C or T	C	C
	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

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
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	
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	
F968	培養検体	TKYE6968_2020	LC542976	2/17		武漢型	H3	
F3319	培養検体	TKYE63319_2020	LC581364	3/18		武漢型	H4	
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	
F3557	培養検体	TKYE63557_2020	LC581365	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
		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
F3558	培養検体	TKY3558E6_2020	LC581367	3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
		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
F3583	臨床検体	TKY3583_2020	LC549340	3/23	海外渡航歴 (スペイン)	欧州型	H9	
F3736	培養検体	TKYE63736_2020	LC581369	3/25	A病院集団感染	武漢型	H5	
		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
F3738	培養検体	TKYE63738_2020	LC581371	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
		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
F3751	培養検体	TKYE63751_2020	LC581373	3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
		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
F4688	培養検体	TKYE64688_2020	LC581375	3/31		武漢型	H6	
		TKYE64688d_2020	LC581376	3/31		武漢型	H6	TKYE64688_2020から3塩基欠失株
F5734	培養検体	TKYE65734_2020	LC556315	4/2		欧州型	H11	
F9588	臨床検体	TKY9588_2020	LC553257	4/16		欧州型	H10	
F9810	臨床検体	TKY9810_2020	LC553258	4/16		欧州型	H10	
F10256	臨床検体	TKY10256_2020	LC553259	4/18		欧州型	H12	
F10419	培養検体	TKYE610419_2020	LC556316	4/18		欧州型	H13	
F10459	臨床検体	TKY10459_2020	LC553260	4/18		欧州型	H14	
F10461	臨床検体	TKY10461_2020	LC553261	4/18	B病院集団感染	欧州型	H15	
F10466	臨床検体	TKY10466_2020	LC553262	4/18	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10468	臨床検体	TKY10468_2020	LC553263	4/18	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10497	培養検体	TKYE610497_2020	LC556317	4/19		欧州型	H14	
F10504	培養検体	TKYE610504_2020	LC556318	4/19	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10510	培養検体	TKYE610510_2020	LC556319	4/19	B病院集団感染	欧州型	H15	
F10513	培養検体	TKYE610513_2020	LC572067	4/19	B病院集団感染	欧州型	H14	
F10670	培養検体	TKYE610670_2020	LC556320	4/20		欧州型	H10	
F10850	培養検体	TKYE610850_2020	LC556321	4/20		欧州型	H15	
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	
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	
F11964	培養検体	TKYV11964_2020	LC556322	4/23		欧州型	H19	
F12492	培養検体	TKYV12492_2020	LC556323	4/24		欧州型	H20	
F12527	培養検体	TKYE612527_2020	LC565409	4/25		欧州型	H21	
F12551	培養検体	TKYE612551_2020	LC565410	4/25		欧州型	H10	
F12689	培養検体	TKYV12689_2020	LC565411	4/25		欧州型	H22	
F13035	培養検体	TKYE613035_2020	LC565412	4/27		欧州型	H10	
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	
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	
F14327	培養検体	TKYE614327_2020	LC567851	5/1	C病院集団感染	欧州型	H26	
F14862	培養検体	TKYE614862_2020	LC567852	5/3		欧州型	H27	
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	
F15220	培養検体	TKYE615220_2020	LC567853	5/6	家族内感染 (15221 と同家族)	欧州型	H29	
F15221	培養検体	TKYE615221_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	H31	
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	
F17926	臨床検体	TKY17926_2020	LC567859	5/30	D病院集団感染	欧州型	H34	

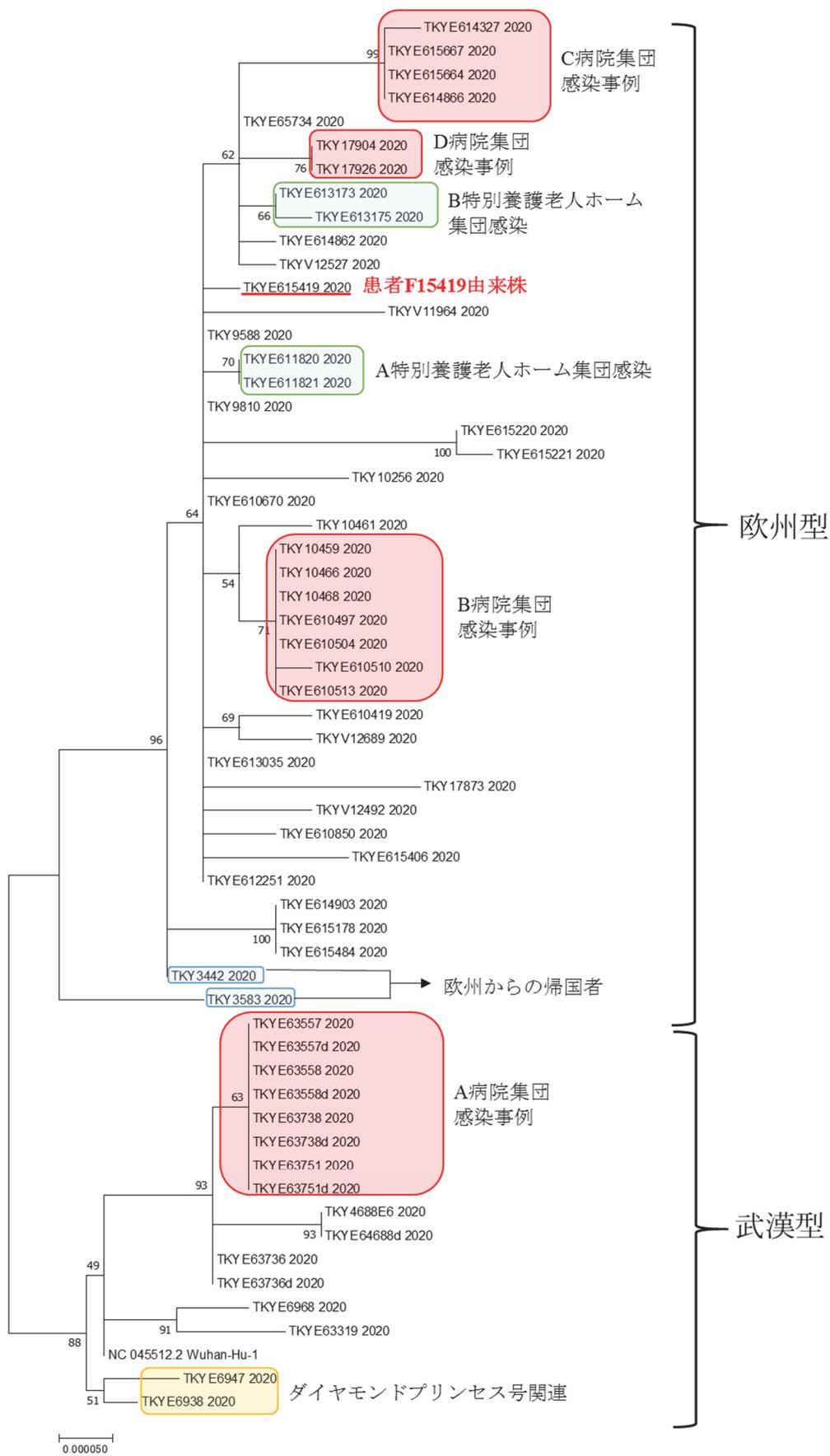


図 1. SARS-CoV-2 全長配列の系統樹解析

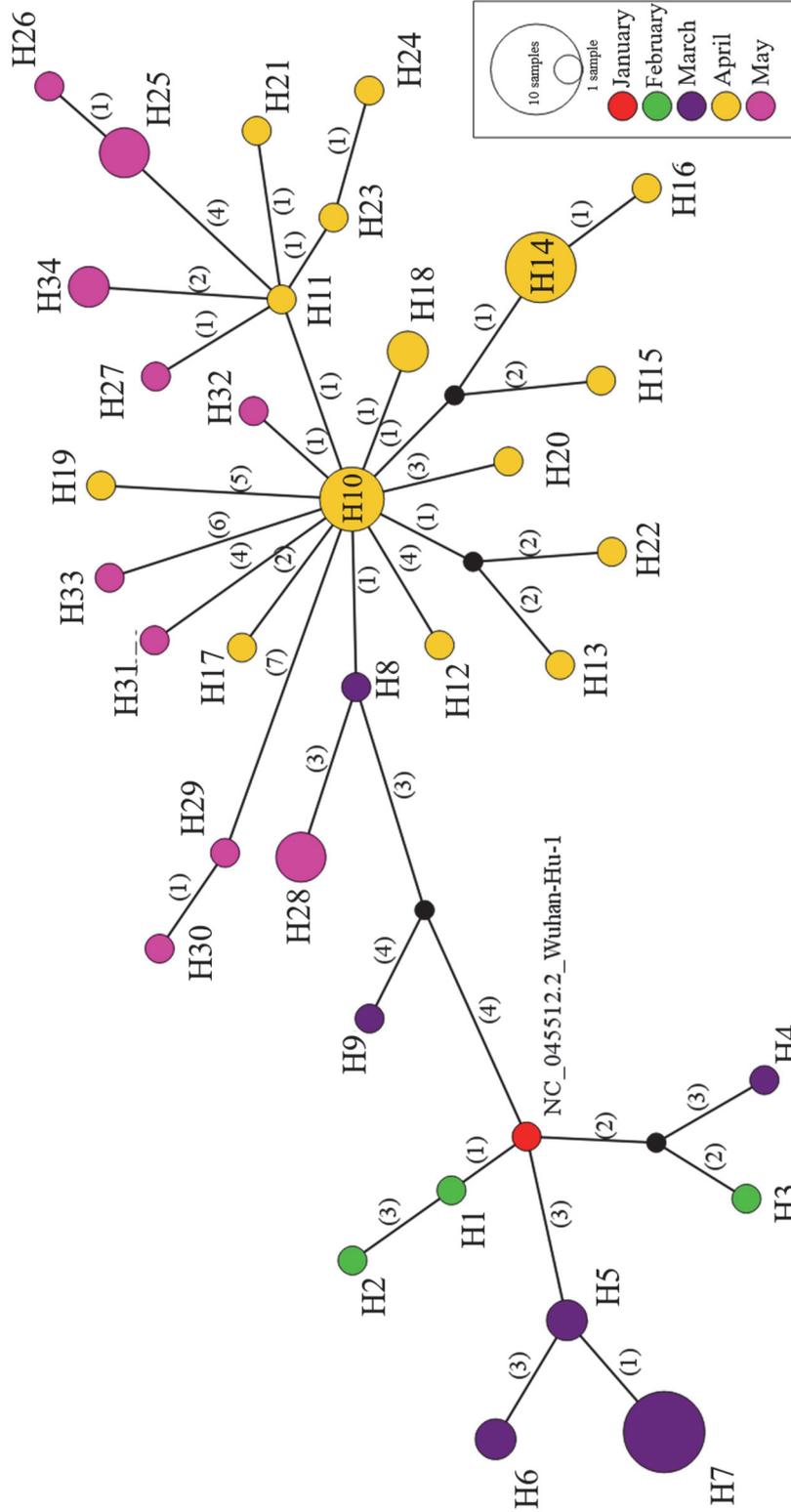


図 2. SARS-CoV-2 のハプロタイプネットワーク図

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

考 察

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、集団感染事例のあつ

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路による「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

- 1) 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/2020/01/24/20.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)
- 2) 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/1007261/1007327.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)
- 3) Yu, W.B., Tang, G.D., Zhang, L., *et al.*: *Zoological Research*, **41** (3), 247–257, 2020.
- 4) Xiaolu, T., Changcheng, W., Xiang, L., *et al.*; *National Science Review*, **7**: 1012–1023, 2020.
- 5) Forster, P., Forster, L., Renfrew, C., *et al.*: *PNAS*. **117** (17), 9241–9243, 2020.
- 6) 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)
- 8) Nagashima, M. Kumagai, R. Yoshida, I., *et al.*: *JJID*, **73**, 320–322, 2020.
- 9) Shirato, K., Nao, N., Katano, H., *et al.*: *JJID*, **73**, 304–307, 2020.
- 10) Leigh, J.W., Bryant D: *Ecol Evol*, **6** (9):1110–1116, 2015.
- 11) 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: 東京健安研七 年 報, **68**, 55–59, 2017.
- 13) Korber, B., Fischer, W.M., Gnanakaran, S., *et al.*: *bioRxiv*. 2020.
- 14) Koyama, T., Weeraratne, D., Snowden, J. L., *et al.*: *Pathogens*, **9** (5), 324, 2020.

**Genetic analysis of SARS-CoV-2 detected in Tokyo using Next Generation Sequencer(NGS)
(February 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