

令和2年度「AMED理事長説明会」  
2020年12月25日（金曜日）



# 新型コロナウイルス SARS-COV-2 ゲノム分子疫学解析と 積極的疫学調査への活用

国立感染症研究所  
病原体ゲノム解析研究センター  
黒田 誠

# ゲノム分子疫学解析

## まず、ゲノムを理解しなければいけない

- ゲノムは生物の基本構造を決定する因子の総体
- 遺伝子 (**gene**) と染色体 (**chromosome**) から合成された言葉で、DNAのすべての遺伝情報のことです。
- 遺伝とは、たとえば鼻の形が似ている、ある病気にかかりやすいなどの、親の生物学的な特徴が子供に伝わることで、それを伝えるDNAの特定の部分が遺伝子です。

# 分子疫学解析

突然生じるダイナミックなゲノム構造の理解・把握に貢献

## ■ パターン認識による分類法.....塩基長の相違・プロファイリング

- PFGE : 制限酵素で切断されて得られたDNAバンド
- MLVA: 複数のリピート領域のリピート回数の違い
- IS-printing: 特有の挿入配列 IS の挿入位置に起因したDNAバンド

時間軸（分子時計）に沿った系統関係の理解・把握に貢献

## ■ 塩基変異を元にした系統分類.....GATC塩基の相違・プロファイリング

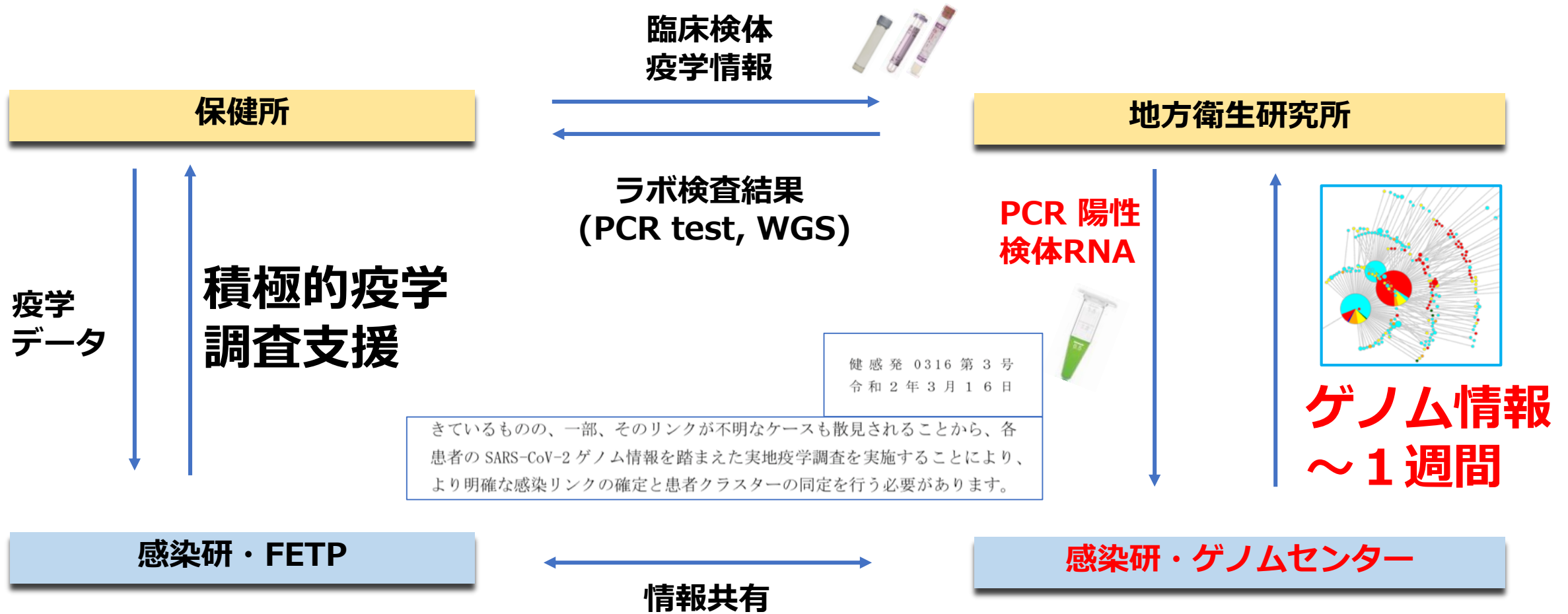
- MLST: 7箇所の代謝遺伝子の塩基配列による分子系統
- Core-genome SNVs (MLST):  
ゲノム長の全体共通領域を活用した MLST (cg-MLST と呼ぶ)

病原性・薬剤耐性等、株固有の特徴の理解に貢献

## ■ 固有配列を元にした分類.....遺伝子の有無・プロファイリング

- Pan-genome analysis:  
プラスミド、ファージ等の外来配列（病原性、薬剤耐性等）の有無による分類

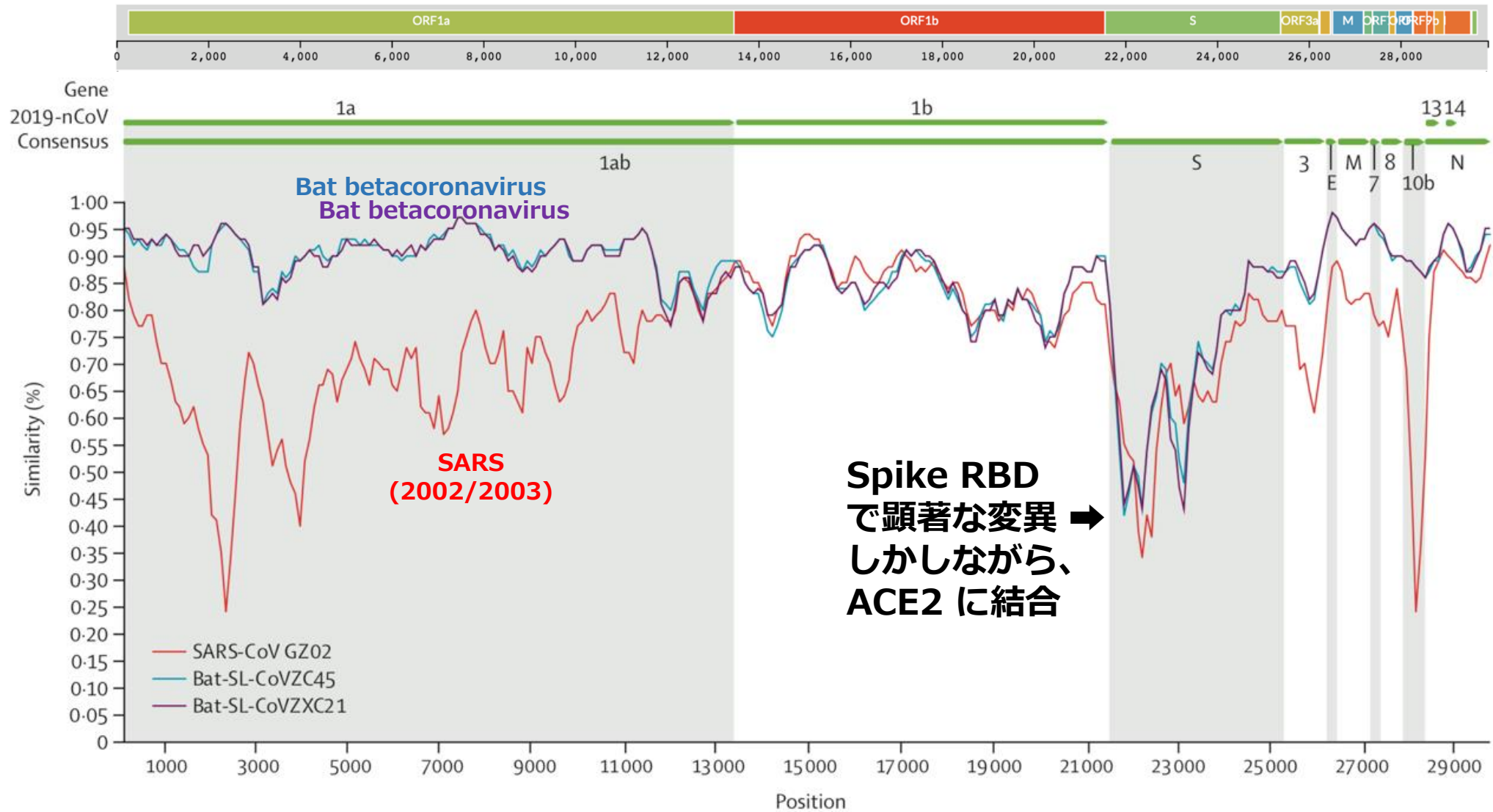
# COVID-19 検査手順概要



# SARS-CoV-2 ゲノム構造

Wuhan-Hu-1  
(MN908947, 2019/12/26)

+ strand RNA virus, 29.9 kb



# Whole genome sequence of SARS-CoV-2 (29.9 kb, +strand RNA virus)

PLOS ONE

PUBLISH ABOUT BR

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

## Disentangling primer interactions improves SARS-CoV-2 genome sequencing by multiplex tiling PCR

Kentaro Itokawa, Tsuyoshi Sekizuka, Masanori Hashino, Rina Tanaka, Makoto Kuroda

Published: September 18, 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239403>

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0239403>

## NIID methods: improved accuracy of WGS

protocols.io

Kentaro Itokawa / Publications / nCoV-2019 sequencing protocol for illumina

nCoV-2019 sequencing protocol for illumina V.2  
Forked from nCoV-2019 sequencing protocol

Kentaro Itokawa<sup>1</sup>, Tsuyoshi Sekizuka<sup>1</sup>, Masanori Hashino<sup>1</sup>, Rina Tanaka<sup>1</sup>, Makoto Kuroda<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>National Institute of Infectious Diseases, Japan

1 Works for me dx.doi.org/10.17504/protocols.io.betejeje

Apr 08, 2020

Run

Bookmark

Copy / For

Coronavirus Method Development Community

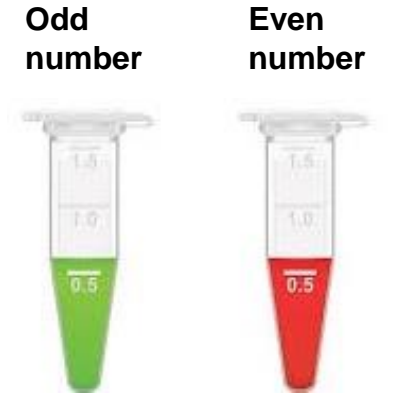
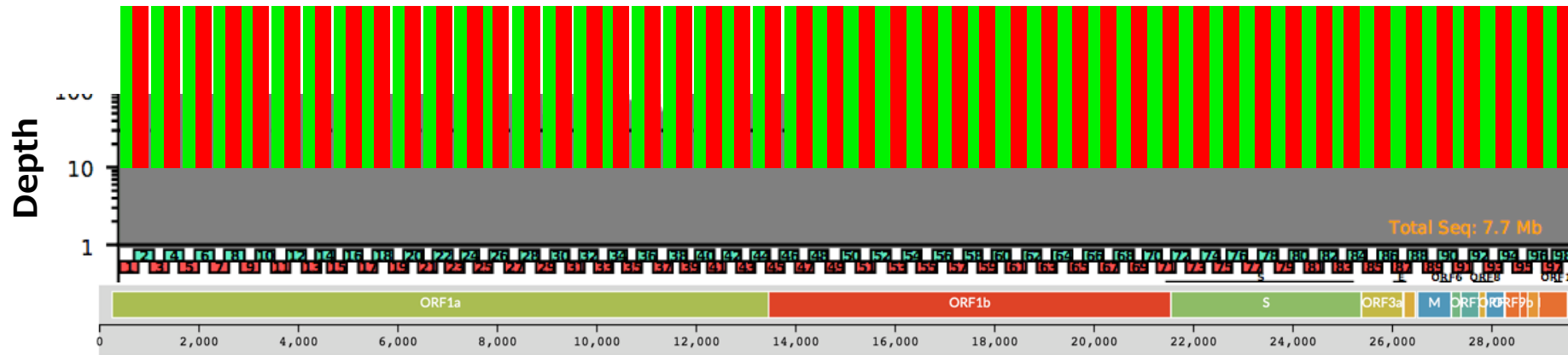
Kentaro Itokawa  
National Institute of Infectious Diseases, Japan

Steps Abstract Guidelines Materials Metadata Metrics

<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-for-illumina-bnn7mdhn>

糸川健太郎

49 multiplex の チューブ2本 = 計 98カ所の PCR増幅



Wuhan-Hu-1  
(MN908947, 2019/12/26)

SARS-CoV-2 ゲノム構造

+ strand RNA virus, 29.9 kb

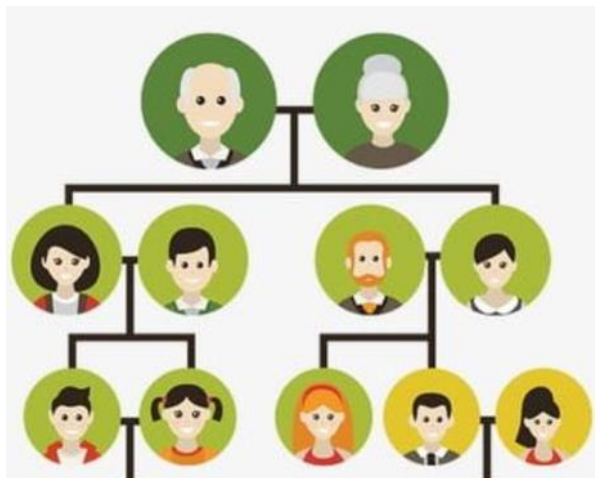
**ゲノム情報をどのように利活用すれば、  
感染リンクの推定ができるのか？**

# Genealogy 系図 (Family tree 家系図)

時間経過

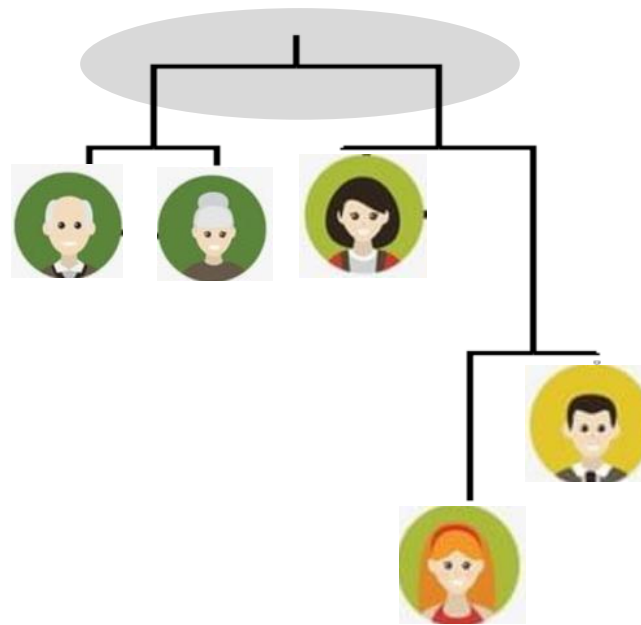


## Family tree



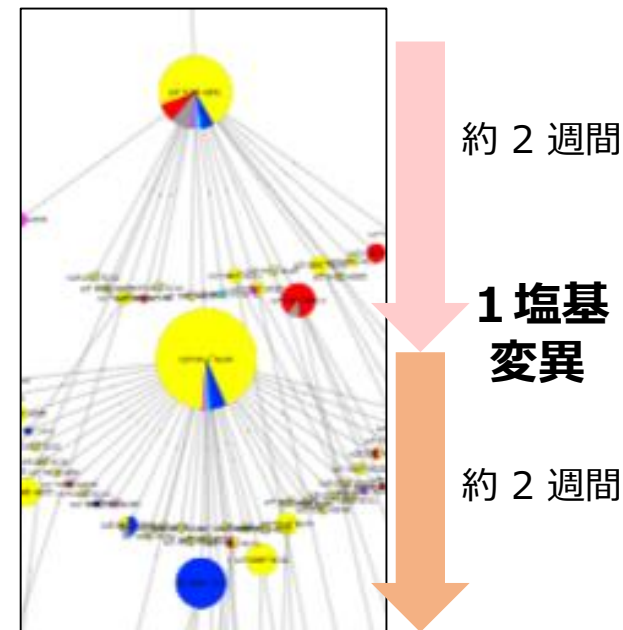
家系図は親子関係が明確

## Phylogenetic tree



系統樹は枝分かれして、親子関係を示すには不向き





## Haplotype network



(修復や組換えが無いことを前提)  
変異の積み重ねを時系列でつなぐ



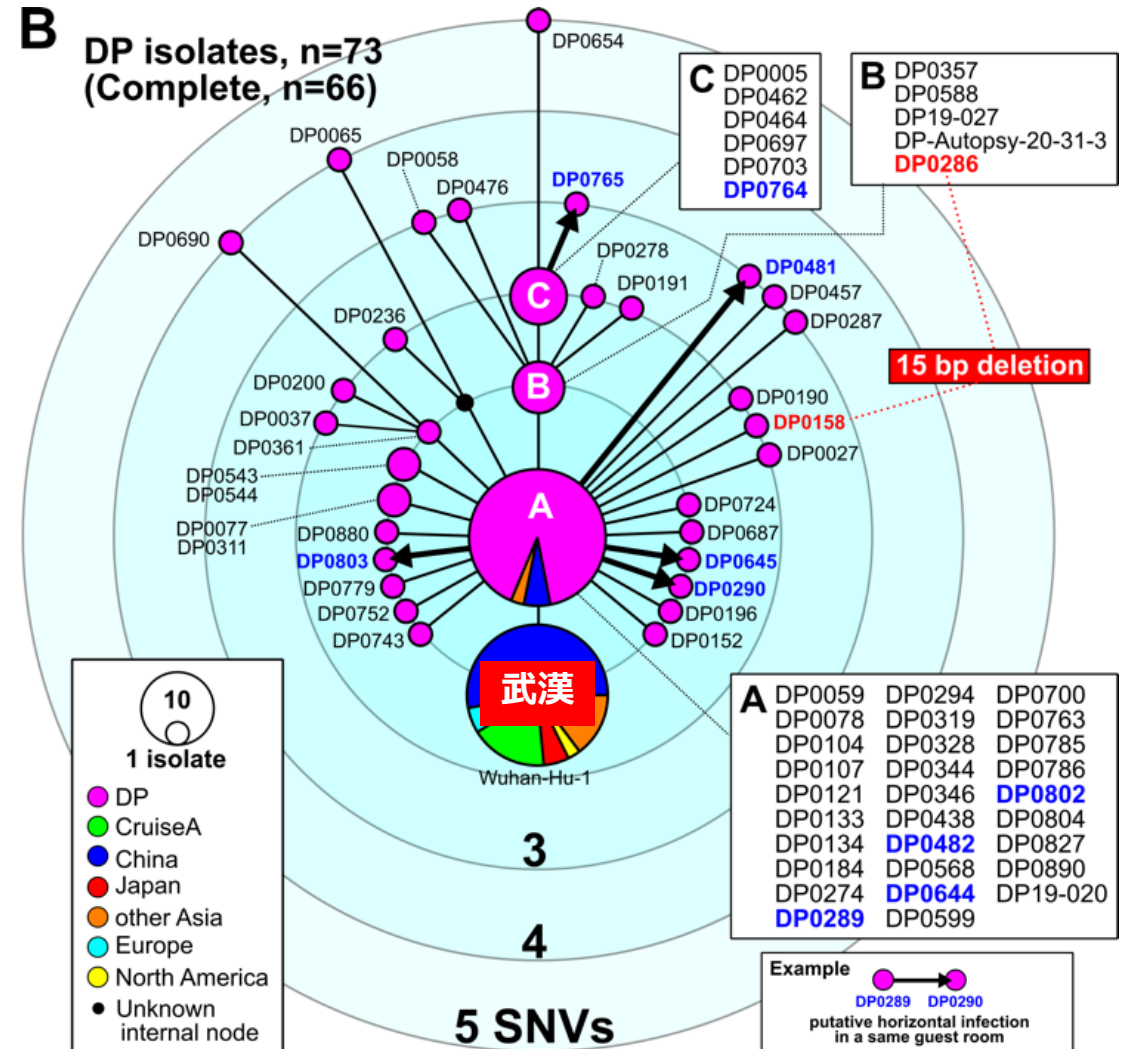
# Haplotype networks of SARS-CoV-2 infections in the *Diamond Princess* cruise ship outbreak

 Tsuyoshi Sekizuka, Kentaro Itokawa, Tsutomu Kageyama, Shinji Saito, Ikuyo Takayama, Hideki Asanuma, Naganori Nao, Rina Tanaka, Masanori Hashino,  Takuri Takahashi, Hajime Kamiya,  Takuya Yamagishi,  Kensaku Kakimoto, Motoi Suzuki, Hideki Hasegawa, Takaji Wakita, and Makoto Kuroda

PNAS August 18, 2020 117 (33) 20198–20201; first published July 28, 2020 <https://doi.org/10.1073/pnas.2006824117>



2019/12 に分離されゲノム解読された  
中国・武漢 Wuhan-Hu-1 を  
ゲノム情報での “原点 (始点)” としている

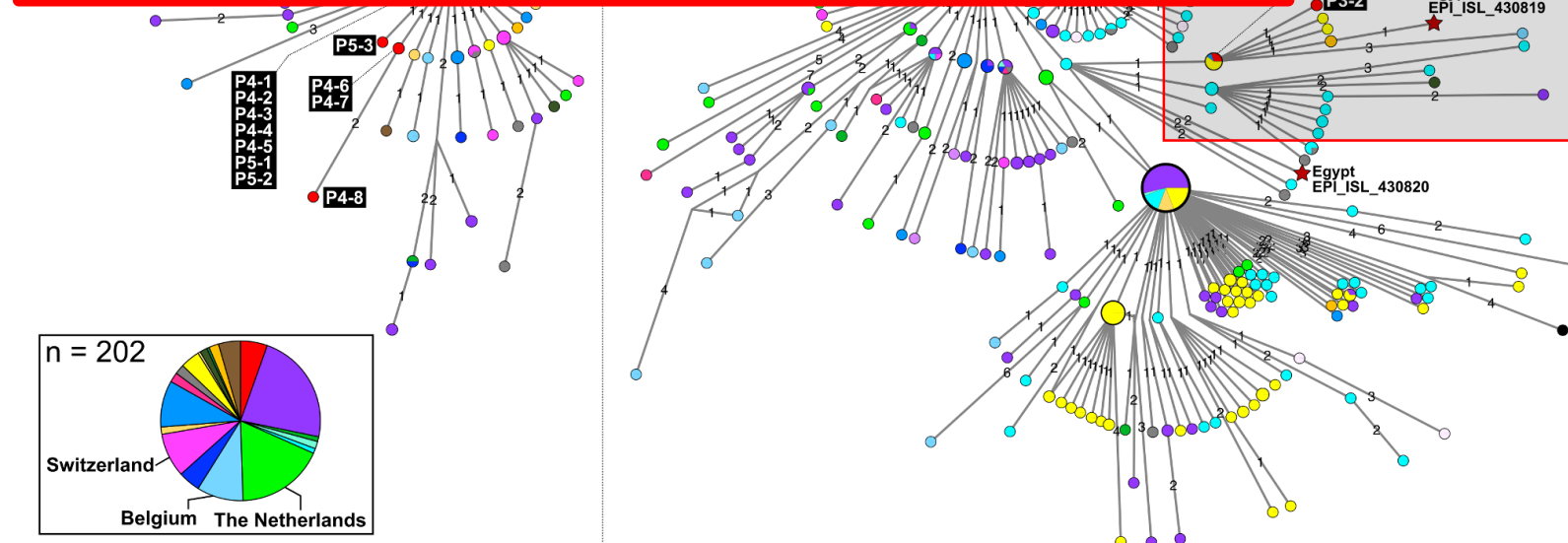
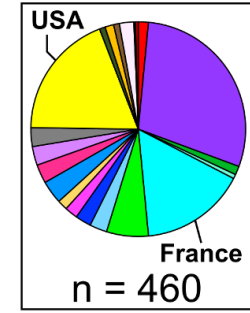
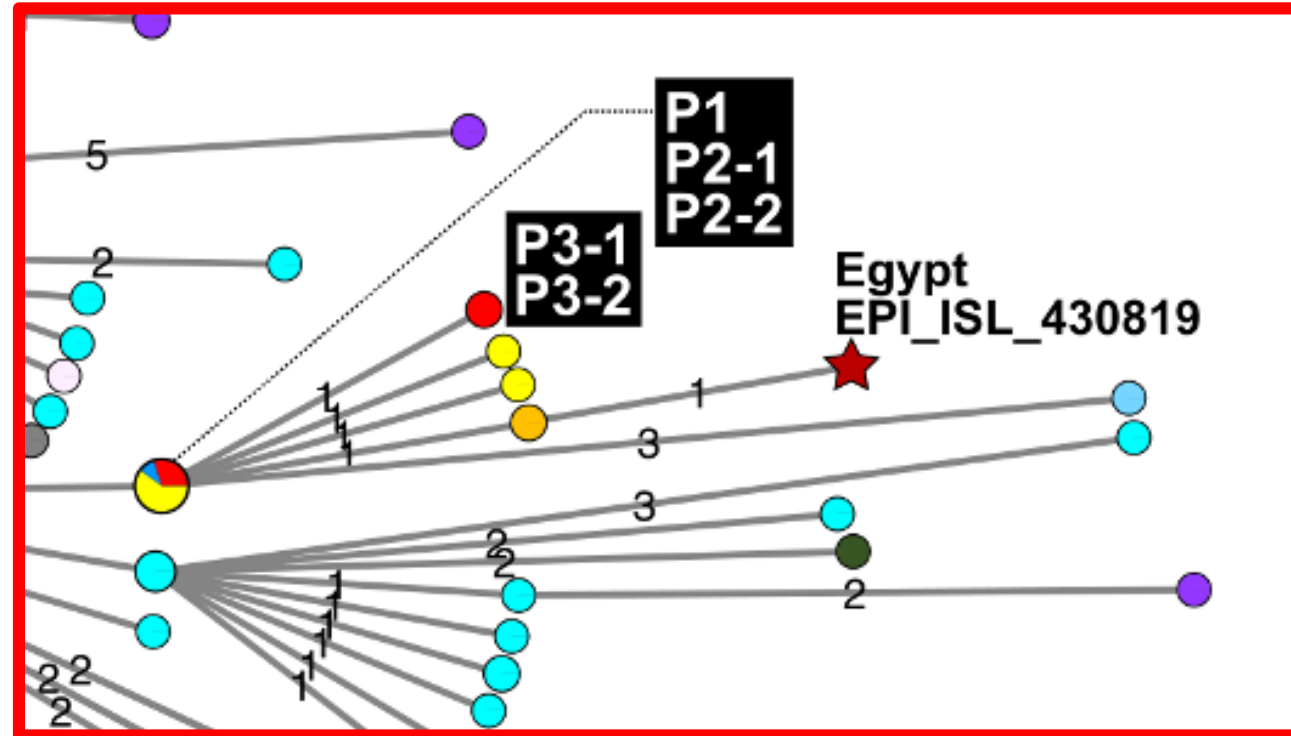
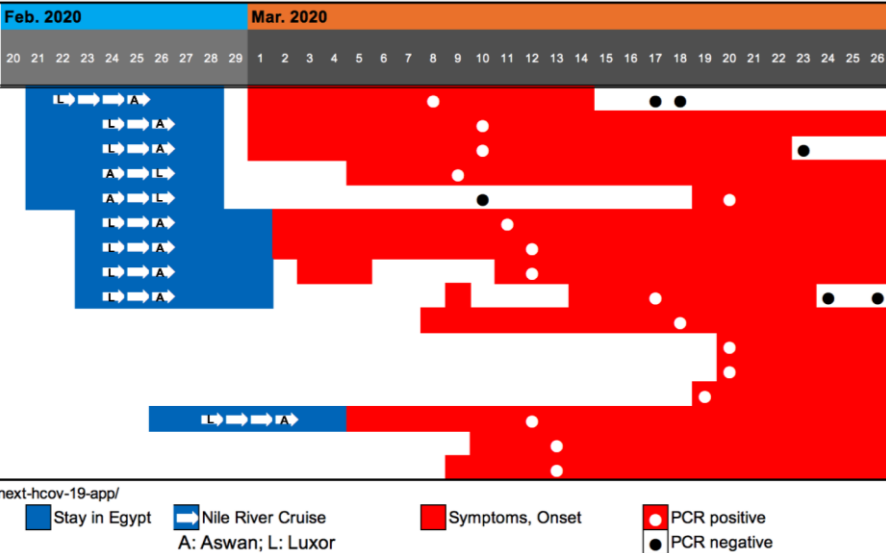




# SARS-CoV-2 Genome Analysis of Japanese Travelers in Nile River Cruise

Tsuyoshi Sekizuka<sup>1</sup>, Sanae Kuramoto<sup>2</sup>, Eri Nariai<sup>2</sup>, Masakatsu Taira<sup>3</sup>, Yushi Hachisu<sup>3</sup>, Akihiko Tokaji<sup>4</sup>, Michiyo Shinohara<sup>5</sup>, Tsuyoshi Kishimoto<sup>5</sup>, Kentaro Itokawa<sup>1</sup>, Yusuke Kobayashi<sup>6</sup>, Keisuke Kadokura<sup>6</sup>, Hajime Kamiya<sup>6</sup>, Tamano Matsui<sup>6</sup>, Motoi Suzuki<sup>6</sup> and Makoto Kuroda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, <sup>2</sup> Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Kanazawa, Japan, <sup>3</sup> Chiba Prefectural Institute of Public Health, Chiba, Japan, <sup>4</sup> Kochi Prefectural Institute of Public Health, Kochi, Japan, <sup>5</sup> Saitama Prefectural Institute of Public Health, Saitama, Japan, <sup>6</sup> Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan



~2020年**8月まで**の JAPAN のゲノム情報を元に

# SARS-CoV-2 ゲノム ハプロタイプ・ネットワーク (世界版 2020/08/06)

Total: 34,239  
JAPAN: 4,952

- Africa (n=398)
- China (n=683)
- Diamond Princess cruise (n=66)
- Eu
- Ja
- North America (n=10,376)
- Oceania (n=1,336)
- Eastern Asia (n=971)
- CruiseA (n=22)
- 907 samples



RESEARCH ARTICLE  
Clinical Science and Epidemiology

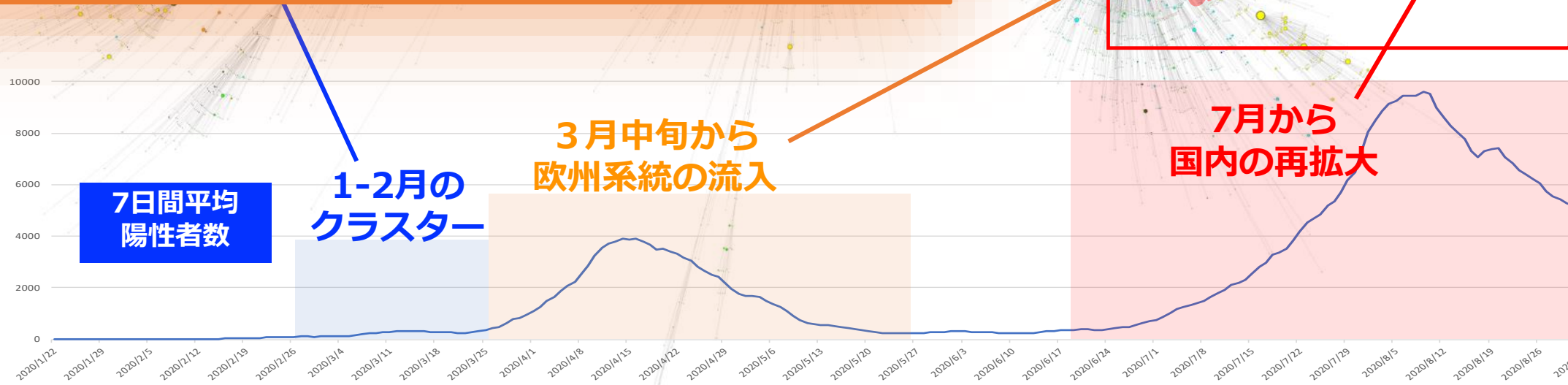


## A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan

Tsuyoshi Sekizuka,<sup>a</sup> Kentaro Itokawa,<sup>a</sup> Masanori Hashino,<sup>a</sup> Tetsuro Kawano-Sugaya,<sup>a</sup> Rina Tanaka,<sup>a</sup> Koji Yatsu,<sup>a</sup> Asami Ohnishi,<sup>b</sup> Keiko Goto,<sup>c</sup> Hiroyuki Tsukagoshi,<sup>d</sup> Hayato Ehara,<sup>e</sup> Kenji Sadamasu,<sup>f</sup> Masakatsu Taira,<sup>g</sup> Shinichiro Shibata,<sup>h</sup> Ryohei Nomoto,<sup>i</sup> Satoshi Hiroi,<sup>j</sup> Miho Toho,<sup>k</sup> Tomoe Shimada,<sup>l</sup> Tamano Matsui,<sup>l</sup> Tomimasa Sunagawa,<sup>l</sup> Hajime Kamiya,<sup>l</sup> Yuichiro Yahata,<sup>l</sup> Takuya Yamagishi,<sup>l</sup> Motoi Suzuki,<sup>l</sup> Takaji Wakita,<sup>m</sup> Makoto Kuroda,<sup>l</sup> the COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan

● Japan (n=4,952)

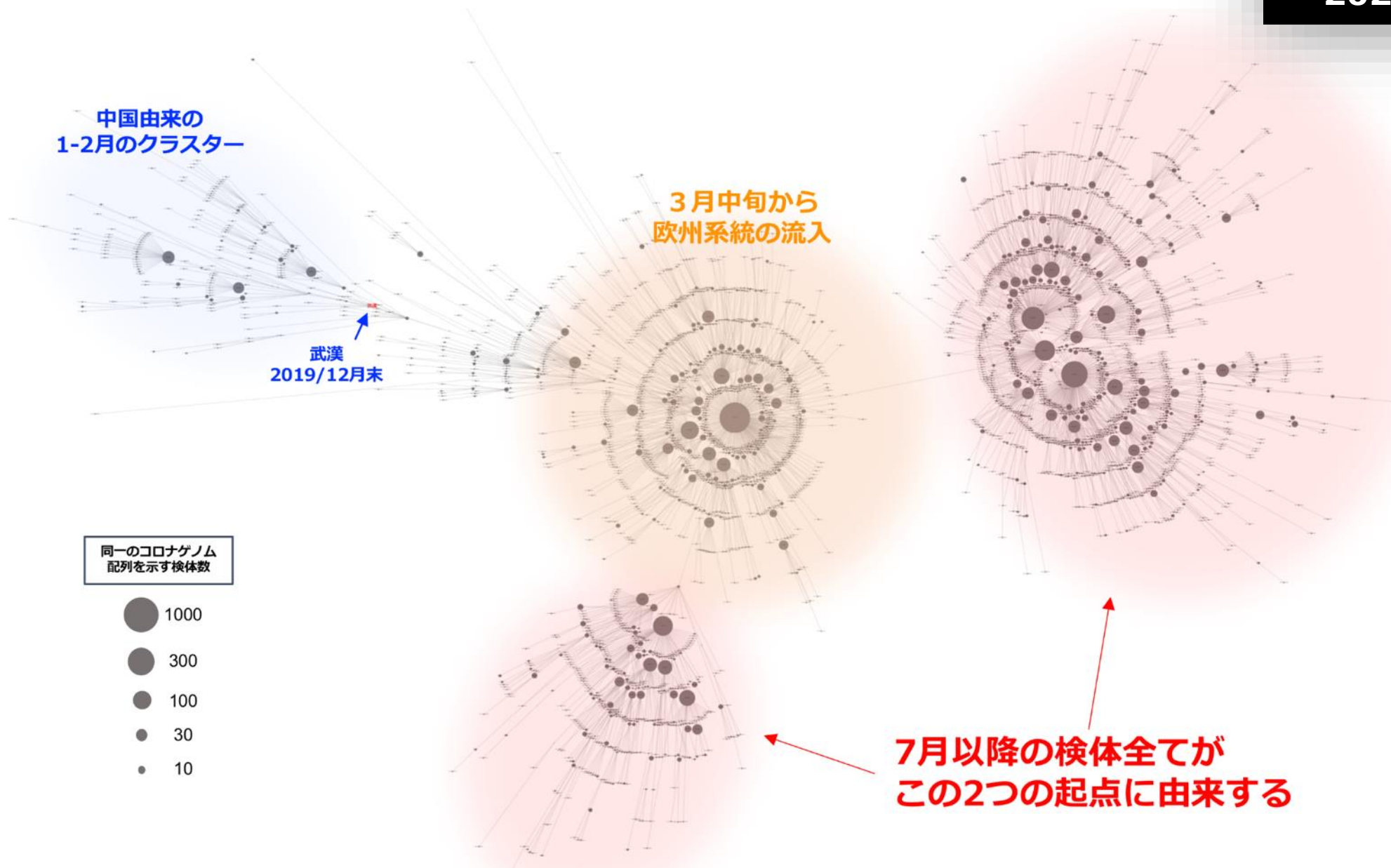
時系列ムービー





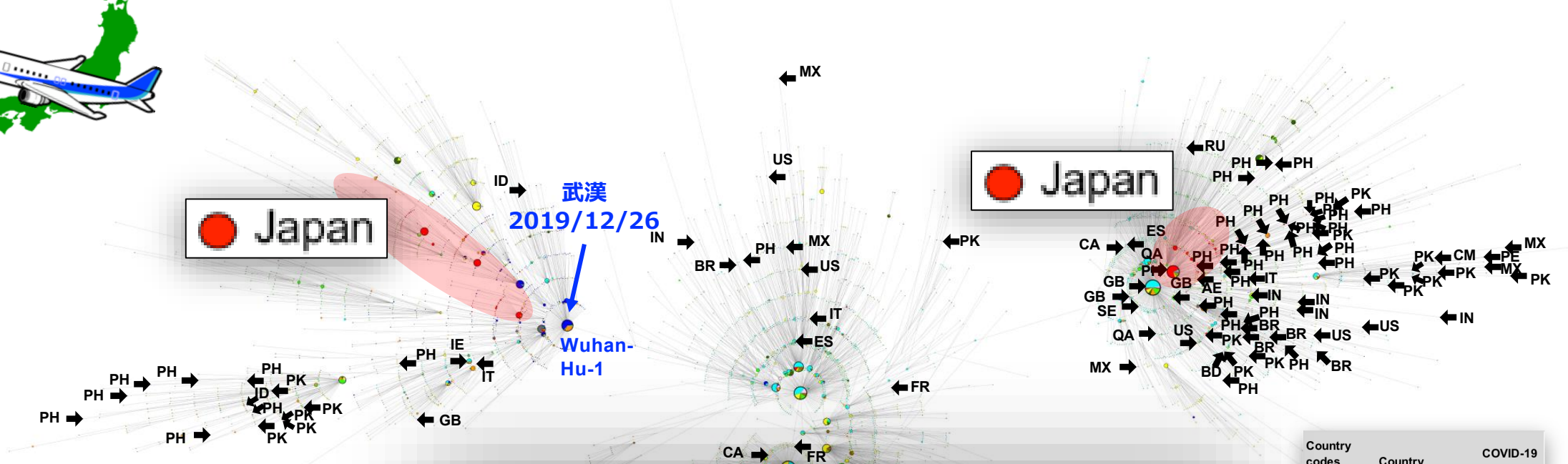
# 〈 国内の新型コロナウイルスゲノム情報 (2020/10/26) 〉

感染研 IASR 速報  
2020/12/11



国内の 9,973 検体のコロナゲノム情報 (2020/10/26現在)

# 〈 空港検疫所で捕捉した新型コロナウイルスゲノム情報 (2020/08/31) 〉



- Africa
- China
- Europe
- Japan
- North America
- Oceania
- South America
- Diamond Princess Cruise ship
- AP
- Eastern Asia
- Western Asia

- 200
- 40
- 10



**JOURNAL of TRAVEL MEDICINE**



**International Society of Travel Medicine**  
Promoting healthy travel worldwide  
Established 1991

*Journal of Travel Medicine*, 2020, 1-3  
doi: 10.1093/jtm/taaa217  
Rapid Communication

---

Rapid Communication

## COVID-19 genome surveillance at international airport quarantine stations in Japan

Tsuyoshi Sekizuka, PhD<sup>1</sup>, Kentaro Itokawa, PhD<sup>1</sup>, Koji Yatsu, BS<sup>1</sup>, Rina Tanaka, BS<sup>1</sup>, Masanori Hashino, MVD, PhD<sup>1</sup>, Tetsuro Kawano-Sugaya, PhD<sup>1</sup>, Makoto Ohnishi, MD, PhD<sup>2</sup>, Takaji Wakita, MD, PhD<sup>2</sup>, Makoto Kuroda<sup>1</sup>, PhD<sup>1,\*</sup> and COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japanese Airport Quarantine

<sup>1</sup>Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan and <sup>2</sup>National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

| Country codes (alpha-2) | Country        | COVID-19 positives |
|-------------------------|----------------|--------------------|
| PH                      | Philippine     | 39                 |
| PK                      | Pakistan       | 22                 |
| BR                      | Brazil         | 9                  |
| IN                      | India          | 9                  |
| US                      | USA            | 9                  |
| GB                      | United Kingdom | 8                  |
| MX                      | Mexico         | 6                  |
| CA                      | Canada         | 3                  |
| ID                      | Indonesia      | 3                  |
| IT                      | Italy          | 3                  |
| ES                      | Spain          | 2                  |
| FR                      | France         | 2                  |
| IR                      | Iran           | 2                  |
| QA                      | Qatar          | 2                  |
| Other                   | -              | 10                 |

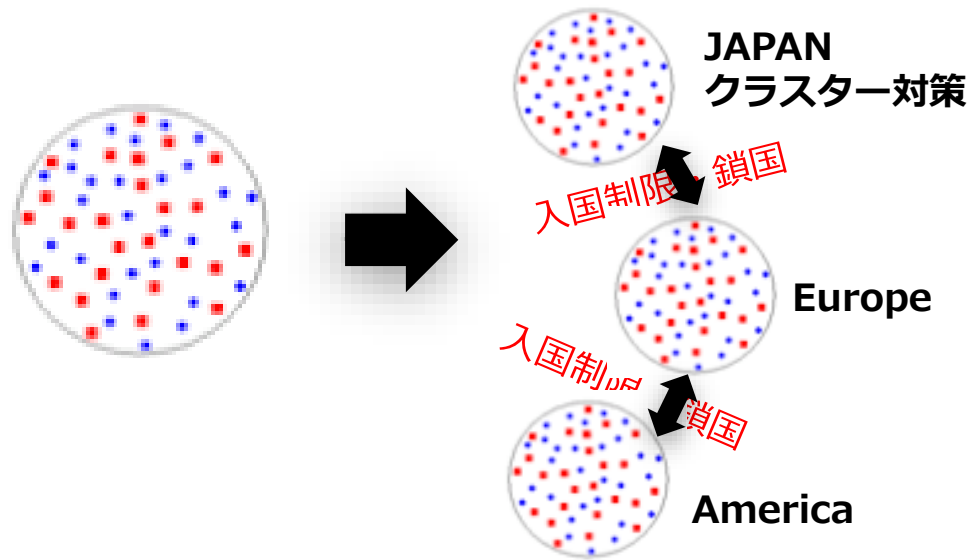
複数の海外流入を受けている。  
空港検疫所の水際で阻止。

# 創始者効果（そうししゃこうか、Founder effect）

「隔離された個体群が新しく作られるときに、新個体群の個体数が少ない場合、元になった個体群とは異なった遺伝子頻度の個体群が出来ること」を指す。

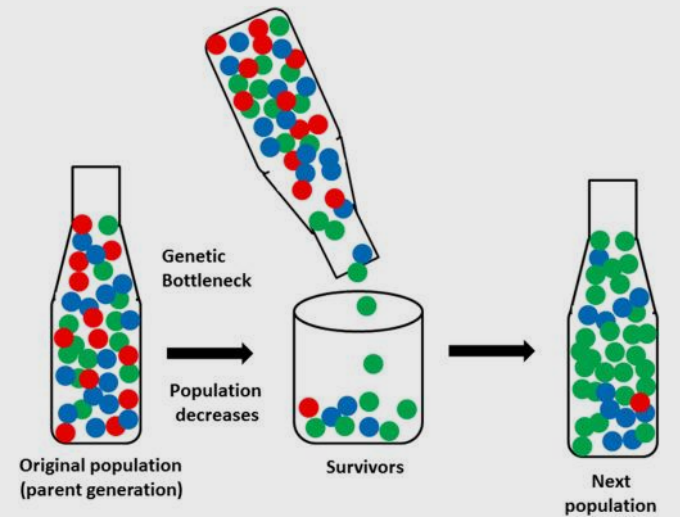
生態学・集団遺伝学の用語。始祖効果（しそこうか）、入植者効果（にゅうしょくしゃこうか）とも呼ぶ。

**最初に入ったものが勝ち！（理論）**



引用: Wikipedia 創始者効果

**生き残った（理論）  
ボトルネック効果**



生物集団の個体数が激減して子孫が繁殖し、元とは異なる集団ができること。

# ゲノム情報を俯瞰的に見て感じることに

- 都市圏を発端にした全国規模クラスターが顕在化し、**現在の国内発生は2つの起点がもと**と推定された。
- 3-4月・欧州系統の中心クラスターから**300を超える系譜へ分岐し発生したものの、この2起点のみ残し他はすべて消滅**していることが示された。
- この2つの起点（クラスター）を早期探知できていれば、6月の段階で完全に抑え込めた可能性がある。
- 6月の陽性者底値（～60陽性/全国）を達成できたのは、国民全体に広く外出自粛等の負担をお願いしたこと、そして保健所による前向きな接触者調査と囲い込みが有効であったと推察される。



## 協力施設

北海道立衛生研究所  
札幌市衛生研究所  
小樽市保健所  
仙台市衛生研究所  
山形県衛生研究所  
福島県衛生研究所  
福島市保健所  
郡山市保健所  
新潟県保健環境科学研究所  
新潟市衛生環境研究所  
茨城県衛生研究所  
栃木県保健環境センター  
群馬県衛生環境研究所  
埼玉県衛生研究所  
さいたま市健康科学研究センター  
川口市保健所衛生検査課  
川越市保健所衛生検査課  
越谷市衛生試験所  
千葉県衛生研究所  
千葉市環境保健研究所  
船橋市保健所 保健総務課  
東京都健康安全研究センター  
江戸川区保健衛生研究センター  
新宿区保健所  
千代田区保健所  
墨田区保健所  
大田区保健所

神奈川県衛生研究所  
横浜市衛生研究所  
川崎市健康安全研究所  
相模原市衛生研究所  
長野県環境保全研究所  
静岡市環境保健研究所  
富山県衛生研究所  
石川県保健環境センター  
福井県衛生環境研究センター  
名古屋市衛生研究所  
岐阜県保健環境研究所  
岐阜市衛生試験所  
三重県保健環境研究所  
滋賀県衛生科学センター  
京都市衛生環境研究所  
地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所  
堺市衛生研究所  
兵庫県立健康科学研究所  
神戸市環境保健研究所  
姫路市環境衛生研究所  
尼崎市立衛生研究所  
和歌山県環境衛生研究センター  
和歌山市衛生研究所  
鳥取県衛生環境研究所  
岡山県環境保健センター  
広島市衛生研究所  
山口県環境保健センター

徳島県立保健製薬環境センター  
香川県環境保健研究センター  
愛媛県立衛生環境研究所  
高知県衛生環境研究所  
福岡県保健環境研究所  
福岡市保健環境研究所  
北九州市保健環境研究所  
佐賀県衛生薬業センター  
長崎県環境保健研究センター  
長崎市保健環境試験所  
大分県衛生環境研究センター  
熊本県保健環境科学研究所  
熊本市環境総合センター  
宮崎県衛生環境研究所  
鹿児島県環境保健センター  
沖縄県衛生環境研究所  
空港検疫所  
(成田、羽田、中部、関西、福岡)  
のご協力を受けた。

# 謝 辞

検体採取等調査にご協力いただきました医療機関、保健所および行政機関の関係者に深謝致します。  
本研究は日本医療研究開発機構 AMED（研究課題番号： JP19fk0108104, JP20fk0108103）  
の研究支援を受け実施した。

## 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター (Pathogen Genomics Center, NIID)

関塚剛史 Tsuyoshi Sekizuka  
糸川健太郎 Kentaro Itokawa  
谷津弘仁 Koji Yatsu  
橋野正紀 Masanori Hashino  
川野哲郎 Tetsuro Kawano-Sugaya  
田中里奈 Rina tanaka  
衛藤皐 Satsuki Eto  
染野里紗 Risa Someno

## 国立感染症研究所・感染症疫学センター FETP

## 国立感染症研究所・ウイルス第三部

## 国立感染症研究所・感染病理部

## 国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター

