

学位論文

「感染症起因ウイルスの検出・解析を目的とした
遺伝子検査法の開発」

指導教授名 石井 直仁

申請者氏名 長島 真美

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて
正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

ウイルス感染症の早期診断は、患者を早期に適切な治療へと繋ぐために重要であり、感染症の蔓延を防ぐ上でも重要な役割を持つ。また、ウイルスは多様であり、同種類であっても薬剤耐性変異ウイルスや多くのサブタイプが存在する。これらのウイルスを検出と同時に分類することは治療戦略もしくは疫学上、大きな意味がある。そこで、本研究では主としてリアルタイム PCR 法を用いた検出法等を開発し、感染症起因ウイルスの迅速・高感度な検出・解析を目的とし本研究を実施した。

まず、口内炎、性器ヘルペスや脳炎などを起こす単純ヘルペスウイルス (*herpes simplex virus* : HSV) の型別かつウイルス定量が可能な迅速検査法の構築を目的として、*real-time PCR* 法の開発を行った。開発法は、他のヘルペス群ウイルス (VZV, EBV, HHV-6 等) との交差反応はなく、HSV-1 及び HSV-2 を特異的に検出し、両ウイルスともに 15copies/tube 以上の遺伝子量があれば検出・定量が可能であることが確認された。さらに、HSV-1 と HSV-2 とで異なる色素を標識した蛍光プローブを用いることで、検出感度を落とすことなく同時に HSV-1 及び HSV-2 遺伝子を検出できることが確認された。実際に、東京都内の性感染症病原体定点医療機関から搬入された検体で検討したところ、HSV-2 感染が多いとされてきた性器ヘルペスにおいて、HSV-1 が検出される割合が高くなっていることを明らかにした。

次に、2009 年に新型インフルエンザとして席卷したのちに季節性インフルエンザとなった AH1N1pdm09 について、オセルタミビル (タミフル) 耐性ウイルスの有無を調査する目的で検討を行った。オセルタミビル耐性ウイルスは、ノイラミニダーゼタンパク質の 275 位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換 (H275Y) されたアミノ酸変異を持つ。H275H/Y を検出する *real-time PCR* 法は一度に多数検体の検出が可能であり、シーケンス法による解析よりも短時間で解析できることから、ウイルス分離株のみならず臨床検体のスクリーニング検査としての有効性が示された。

次に、新型コロナウイルス (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 遺伝子が検出された COVID-19 患者由来の咽頭ぬぐい液を VeroE6 細胞に接種し、SARS-CoV-2 を分離し (TKYE6182_2020 株)、次世代シーケンサーを用いた解析を行い、29,903 塩基の配列を決定した (GenBank Accession No. LC529905)。また、SARS-CoV-2 はプロトタイプ株である Wuhan-Hu-1 株の 8,782 番目及び 28,114 番目の塩基の違いによって 2 つのサブタイプ (L または S) に分類される。Wuhan-Hu-1 株は 8,782 番目が C、28,114 番目が T の L タイプであり、TKYE6182_2020 も 同じ L タイプであることが明らかとなった。

開発した *real-time PCR* 法を利用して、COVID-19 の重症度が異なる患者の尿中の SARS-CoV-2 遺伝子の検出及び排出期間を調査した。それまで、尿から SARS-CoV-2 は検出されないとされていたが、高感度なリアルタイム PCR により COVID-19 と診断された 20 人中 2 人の尿から SARS-CoV-2 遺伝子が検出された。1 例は重度の COVID-19 患者で、5 日間

尿中へのウイルス排出が確認されたことから、尿を含め、中等度から重度の COVID-19 の患者の検体を扱う際には、感染予防と管理措置も講じる必要があることを明らかにした。

本研究では、主にリアルタイム PCR 法等を用い、HSV-1/2 検査法、薬剤耐性インフルエンザウイルス検査法、COVID-19 検査法等を開発した。これらの方法により、性器ヘルペスにおける HSV-1 の関与、オセルタミビル耐性ウイルスの存在を明らかにし、さらに高感度な SARS-CoV-2 検査法の構築により、重症患者の尿からの SARS-CoV-2 が検出されることを明らかにした。また、本研究で開発した方法は、東京都における行政検査で利用されている。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 単純ヘルペス 1 型及び 2 型ウイルス検査のための Multiplex Real-time PCR 法の開発	2
2-1. 材料及び方法	2
2-1-1. real-time PCR 用プライマー及びプローブの設定	2
2-1-2. real-time PCR 用標準 DNA の作製	2
2-1-3. real-time PCR 法による遺伝子の検出	2
2-1-4. multiplex real-time PCR 法による HSV 遺伝子の検出	3
2-1-5. PCR 法による HSV 遺伝子の検出	3
2-1-6. ウイルス DNA の調製	3
2-2. 結果	4
2-2-1. real-time PCR 法の検出感度と定量性	4
2-2-2. ウイルス株抽出 DNA に対する real-time PCR 法の検出感度と PCR 法との比較	4
2-2-3. Multiplex real-time PCR 法の検討	4
2-3. 考察	4
3. 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm2009 におけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出	7
3-1. 材料及び方法	7
3-1-1. 供試材料及び供試材料からの RNA 抽出	7
3-1-2. RT-nested-PCR 法	8
3-1-3. ダイレクトシーケンス法	8
3-1-4. 薬剤耐性変異の解析	8
3-1-5. real-time PCR 法用標準 DNA の作製	9
3-1-6. real-time PCR 法	9
3-2. 結果及び考察	9
3-2-1. NA 遺伝子系統樹解析による薬剤耐性変異の解析	9
3-2-2. real-time PCR 法を用いた薬剤耐性変異の検出	10
3-2-3. H275Y 薬剤耐性変異株	10

4. 東京の無症候性キャリアから分離された SARS-CoV-2 の特徴	12
4-1. 材料及び方法	12
4-1-1. 供試材料及び供試材料からの RNA 抽出	12
4-1-2. ウイルス分離試験	12
4-1-3. real-time PCR 法	12
4-1-3. NGS 解析	13
4-2. 結果及び考察	13
4-2-1. ウイルス分離結果	13
4-2-2. ウイルス分離株の遺伝子学的特徴	13
5. 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)	15
5-1. 材料及び方法	15
5-1-1. 供試材料及び供試材料からの RNA 抽出	15
5-1-2. リアルタイム PCR 法	15
5-1-3. NGS 解析	16
5-2. 結果	19
5-2-1. 臨床検体と分離培養株の比較	16
5-2-2. 変異の探索	16
5-2-3. 分子系統樹解析	17
5-2-4. ハプロネットワーク解析	17
5-3. 考察	17
6. 中等度から重度の COVID-19 患者からの尿の慎重な取り扱いについて	20
6-1. 材料及び方法	20
6-2. 結果	20
6-3. 考察	21
7. 総括	22
8. 今後の課題	22
9. 謝辞	23
10. 引用文献	23

11. 業績目録 ----- 28

12. 図表 ----- 29

1. 序論

ウイルス感染症の早期診断は、患者を早期に適切な治療へと繋ぐために重要であり、感染症の蔓延を防ぐ上でも重要な役割を持つ。また、ウイルスは多様であり、同じ種類であっても薬剤耐性変異ウイルスやサブタイプが存在し、これらのウイルスを検出と同時に分類することには大きな意味がある。そこで、リアルタイム PCR 法を用いた検出法等を開発し、感染症起因ウイルスの迅速・高感度な検出・解析を目的とし本研究を実施した。

まず、口内炎、性器ヘルペスや脳炎などを起こす単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) の型別かつウイルス定量が可能な迅速検査法の構築を目的として、real-time PCR 法の開発を行った。

次に、2009年に新型インフルエンザとして席卷したのちに季節性インフルエンザとなった AH1N1pdm09 について、オセルタミビル (タミフル) 耐性ウイルスの有無を調査する目的で検討を行った。

次に、新型コロナウイルス (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 の迅速検査法の構築を目的として、real-time PCR 法の開発を行った。さらに、SARS-CoV-2 遺伝子が検出された COVID-19 患者由来の咽頭ぬぐい液から SARS-CoV-2 を分離し

(TKYE6182_2020 株)、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

加えて、開発した real-time PCR 法を利用して、COVID-19 の重症度が異なる患者の尿中の SARS-CoV-2 遺伝子の検出及び排出期間を調査した。

2. 単純ヘルペス 1 型及び 2 型ウイルス検査のための Multiplex Real-time PCR 法の開発

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) には, 1 型 (HSV-1) 及び 2 型 (HSV-2) があり, ヒトがこれらに感染すると皮膚, 口唇, 口腔, 眼, 生殖器, 中枢神経系など, 極めて多様な部位で症状が現れ, 性器ヘルペス, 急性脳炎, 無菌性髄膜炎等の原因となる¹⁻³⁾. また, 感染後神経節に潜伏・持続感染し, 再活性化して口唇部や陰部の皮膜や粘膜に水疱を再発させる, いわゆる回帰ヘルペスを起こすこともある. 近年, 効果的な抗ウイルス薬治療が行われるようになり, 本感染症においては迅速かつ正確な診断が必要とされるようになってきた. 一方, 診断法としてウイルス分離や血清学的検査がなされてきたが, 近年, Polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子検査が行われるようになり^{4,5)}, ウイルス量が少ない検体から迅速に結果が得られるようになった. しかしながら, 検出感度が十分とはいえず, さらに, HSV-1 と HSV-2 の型別のためのハイブリダイゼーション等の確認試験が必要であった.

そこで, HSV の型別かつウイルス定量が可能な迅速検査法の構築を目的として, real-time PCR 法の確立を試み, 次いで HSV-1 及び HSV-2 の同時検出法 (multiplex 化) の開発を試みた.

2-1. 材料及び方法

2-1-1. real-time PCR 用プライマー及びプローブの設定

HSV の構成タンパクである glycoprotein D (gpD) をコードする遺伝子領域に real-time PCR のプライマー及び TaqMan MGB プローブ設計した. HSV-1 検出用として HSV1-F 及び HSV1-R プライマーと HSV1-probe を, HSV-2 検出用プライマーとして HSV 2-F 及び HSV2-R プライマーと HSV2-probe を用いた (Table 1). なお, 各プライマー及びプローブの設計には, Primer Express v1.5 (アプライドバイオシステムズ: ABI) を用い, それぞれの合成を ABI に依頼した.

2-1-2. real-time PCR 用標準 DNA の作製

real-time PCR 用の標準 DNA として, 各 HSV の gpD 領域に設定したプライマー及びプローブの塩基配列を含む合成鎖 DNA を作成した (ファスマックに合成依頼). 凍結乾燥品を TE 溶液 (10mM TrisHCl, pH8.0; 1mM EDTA, pH8.0) (ナカライテスク) で溶解後, 10 倍段階希釈を行い, 3.0×10^5 copies/ μ L から 0.3 copies/ μ L までの 10 倍段階希釈系列を作製した

2-1-3. real-time PCR 法による遺伝子の検出

96 穴の real-time PCR 用リアクションプレート (ABI) に, TaqMan Universal Master Mix (ABI) 25 μ L, 100 μ M プライマー各 0.5 μ L, 10 μ M プローブ (HSV1-probe または

HSV2-probe) 1.0 μ L, 滅菌蒸留水 18 μ L 及び抽出 DNA (または標準コントロール) 5.0 μ L を混合し, real-time PCR 反応により遺伝子の検出及び定量を行った. 反応条件は, 50 $^{\circ}$ C 2 分及び 95 $^{\circ}$ C 10 分の後, 95 $^{\circ}$ C 1 分及び 57 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 45 回繰り返した. なお, 検出機器として ABI Prism 7900HT (ABI) を使用した.

2-1-4. multiplex real-time PCR 法による HSV 遺伝子の検出

HSV-1 及び 2 型の同時型別を可能にするため, HSV-1 検出用プローブには FAM 色素, HSV-2 検出用プローブには VIC 色素と, それぞれ異なるリポーター色素を標識した (Table1). まず, HSV-1 と HSV2 のプライマー及び両型のプローブを等量ずつ混合し, 25 μ M プライマー混合液及び 5.0 μ M プローブ混合液を作製した. 次いで 96 穴の real-time PCR 用リアクションプレートに, TaqMan Universal Master Mix 25 μ L, プライマー混合液 1.0 μ L, プローブ混合液 1.0 μ L, 滅菌蒸留水 18 μ L 及び抽出 DNA (または標準コントロール) 5.0 μ L を混合し, 前述の条件で real-time PCR 反応を行った.

2-1-5. PCR 法による HSV 遺伝子の検出

real-time PCR 法と PCR 法の検出感度を比較するために, gpD 領域をコードする遺伝子配列の HSV-1 及び HSV-2 に共通した部分に設計されたプライマーペア HS12/HS13⁶⁾を用いた PCR 法を実施した (Table 1). 10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, 2.5m M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (ABI) 4.0 μ L, 100 μ M プライマー各 0.5 μ L, 5U AmpliTaq polymerase (ABI) 0.5 μ L, 滅菌蒸留水 34.5 μ L 及び DNA 抽出液 5.0 μ L を混合し, PCR 反応を行った. 反応条件は, 94 $^{\circ}$ C 1 分, 53 $^{\circ}$ C 2 分及び 72 $^{\circ}$ C 2 分のサイクルを 30 回繰り返した. 特異バンドの確認は, 2.0%アガロースゲル電気泳動により行った.

2-1-6. ウイルス DNA の調製

HSV-1 及び HSV-2 の DNA 調製には, 前者では 東京都での分離株 (03-185/Tokyo) を Hep-2 細胞に 感染させた培養上清, 後者には標準株である MS 株感染細胞溶解液 (ZeptoMetrix) を用いた. それぞれ 200 μ L を SepaGene RV-R (三光純薬) を用いて遺伝子抽出を行い, 滅菌蒸留水 10 μ L に再溶解したものを DNA 溶液とした. 得られた DNA 溶液の濃度は 03-185/Tokyo 株が 1.4×10^7 copies/tube, MS 株が 3.8×10^5 copies/tube であった. それぞれを 10 倍段階希釈し, $10^1 \sim 10^7$ 倍 DNA 希釈液を作製した. HSV の対照ウイルスとして, サイトメガロウイルス (CMV), EB ウイルス (EBV), ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6), ヒトヘルペス 7 型ウイルス (HHV-7) 及び水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) を用いた. CMV, HHV-6 及び HHV-7 は市販の DNA 溶液 (重松貿易) を用いた. また EBV では EBV の 持続感染細胞である Raji 細胞の浮遊液, VZV では乾燥弱毒生水痘ワクチン (阪大微生物研究会) を用い, それぞれ 100 μ L を SepaGene RV-R

を用いて遺伝子抽出を行い、滅菌蒸留水 10 μ L に再溶解したものを DNA 溶液とした。

2-2. 結果

2-2-1. real-time PCR 法の検出感度と定量性

real-time PCR 法の検出感度について、10 倍段階希釈した標準 DNA を用いて検討した結果、15copies/tube では増殖曲線が認められなかったが、Fig. 1-1 に示すように両型とも 15copies/tube から 1.5×10^6 copies/tube の範囲内において、サイクル数に比例し DNA 量の増幅曲線が得られた (Fig. 1-1-A)。また、横軸に DNA コピー数、縦軸に PCR サイクル数をとった片対数グラフはどちらも直線性を示したことから (Fig. 1-1-B)、HSV 遺伝子の定量が可能であることが判明した。これらの成績から、本法による HSV-1 及び HSV-2 の検出感度は、ともに 15copies/tube であると推定された。また、CMV, EBV, HHV-6, 7 及び VZV の DNA を用いて real-time PCR 法を行ったところ、どちらの検出系においても検出されなかった。

2-2-2. ウイルス株抽出 DNA に対する real-time PCR 法の検出感度と PCR 法との比較

HSV-1 分離株 (03-185/Tokyo) 及び HSV-2 標準株 (HSV-2 MS) から抽出した DNA の 10 倍段階希釈液を用いて real-time PCR 法の検出感度と PCR 法とを比較検討した。その結果、Table 2 に示すように、real-time PCR では HSV-1 の検出系では 10^6 DNA 希釈液まで、HSV-2 では 10^5 希釈液まで遺伝子が検出された。一方、PCR 法による検出では、HSV-1 では 10^3 希釈まで、HSV-2 では 10^2 希釈までしか検出されなかった (Table 1-2)。

2-2-3. Multiplex real-time PCR 法の検討

分離株 03-185/Tokyo 株 DNA (1.4×10^7 copies/tube) 及び標準株 MS 株 DNA (3.8×10^5 copies/tube) を用いて multiplex 化の検討を行った結果、 10^2 希釈では HSV-1 (1.4×10^5 copies/tube) は 22cycle 後、HSV-2 (3.8×10^3 copies/tube) は 25cycle 後に明らかな増殖曲線を示した。さらに 03-185/Tokyo 株 DNA の 10^6 希釈 (14copies/tube) あるいは MS 株 DNA の 10^5 希釈 (3.8copies/tube) でも 37 あるいは 40cycle 後に増殖曲線が得られた (Fig. 1-2)。これらの検出感度は、プライマー及びプローブを単独で使用した場合と同じであった (Table 1-3)

2-3. 考察

実験室におけるウイルスの標準検査法として、ウイルス分離試験、蛍光抗体法等による抗原検出法及び血清学的試験がなされてきたが、診断までに長時間を要し、検出感度も低く、早期診断には不向きであった。

近年、PCR 法をはじめとする遺伝子診断技術の向上により、ウイルス感染症は極めて迅

速に診断がなされるようになり、SARS や新型インフルエンザ対策にも応用されている^{7,8)}。HSV 感染症においても、①検査時間の短縮化、②血液、尿、髄液、病理組織など幅広い検体からの検出、③ウイルス量が少ない検体からの検出が可能な PCR 法が開発されてきた^{4,5)}。さらに、アシクロビルをはじめとした HSV に効果的な抗ウイルス薬が開発され、治療における有効性が確認されている現在、ウイルス量と対比した迅速かつ正確な診断の必要性が高まっている。そこで、各種感染症領域で迅速かつ高感度で定量性のある遺伝子診断法であることが確認されている real-time PCR 法による HSV-1 と HSV-2 遺伝子検出法の開発を試みた。

real-time PCR 法を用いた HSV 遺伝子検出法については Schmutzhard⁹⁾らや Iss¹⁰⁾らが SYBER green を使用した方法を報告している。しかしながら SYBER green 法は蛍光標識プローブ法に比べ、特異性が低いことが知られている。一方、Corey¹¹⁾らや Namvar¹²⁾らは蛍光標識プローブ法による HSV の検出法報告している。Corey らは HSV-1 及び HSV-2 共通のプライマーを、Namvar らは両型に共通の下流プライマーを使用し、HSV-1 及び HSV-2 に特異的なプローブを用いて HSV の型別を行っている。しかし、両者とも HSV-1 型別プローブと HSV-2 型別プローブの塩基配列が似ているため、場合によっては HSV-1 と HSV-2 の型別ができない可能性がある。さらに、他のヘルペス群ウイルスが検出されないとの報告がなく、交差反応の存在も否定できない。

今回我々は特異性を高めるため、HSV-1 及び HSV-2 それぞれに特異的なプライマーを設定するとともに、より特異性の高いアニーリングが可能となる MGB プローブを用い、HSV-1 及び HSV-2 それぞれに特異的なプローブを設定し、他のヘルペス群ウイルスを用いて交差反応の有無も検証した。

その結果、著者らが開発した real-time PCR 法では、他のヘルペス群ウイルスの交差反応はなく、HSV-1 及び HSV-2 とも 15copies/tube 以上の遺伝子が存在すれば HSV 遺伝子の検出・定量が可能であることが確認された。

分離株及び標準株から抽出した DNA の 10 倍段階希釈液を用いて conventional PCR 法の検出感度と比較したところ、HSV-1 及び HSV-2 とも real-time PCR 法の方が、 10^3 倍検出感度が高く、かつ迅速に結果が得られることが確認され、臨床検査への応用が可能であることが示唆された。次いで、コスト削減と検体量の節約及び効率化という観点から、HSV-1 と HSV-2 とで異なる色素を標識した蛍光プローブを用い、multiplex 化を検討した。その結果、Fig. 1-2 及び Table 1-3 に示したように、検出感度を落とすことなく HSV-1 及び HSV-2 遺伝子の同時検出が可能であることが確認された。

これまで HSV-2 は性器ヘルペスのみならず髄膜炎患者からも検出されている¹³⁾。また、HSV-2 が多いとされてきた性器ヘルペスにおいても最近では HSV-1 が分離される割合が上昇してきており、HSV-1 と HSV-2 が混在すること、また HSV-1 の性器再発例は HSV-2 に比べ STD としての感染源になる可能性は低いことが報告されている¹⁴⁾。このように、

型により感染リスクが異なる場合があるため、臨床検査の現場においてウイルス型別を実施することは臨床的にも疫学的にも重要である。こうした観点からも開発した multiplex real-time PCR 法は有用であると考ええる。

今回開発した multiplex real-time PCR 法は、1回の検査で短時間にかつ高感度に HSV 遺伝子の検出及び型別ができる。したがって、HSV 感染症の診断が可能の上、定量に基づいた抗ウイルス療法の治療効果のモニタリングや予後の予測も可能であるので^{15,16)}、髄膜炎の検査や性感染症検査を含めたウイルス検査での応用が可能であることが示唆された。

3. 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm2009 におけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

インフルエンザウイルスは、その内部タンパク質の抗原性の違いから A, B, C の三種類に分類され、A 型インフルエンザはさらに Hemagglutinin (HA) 型で 16 種類、Neuraminidase (NA) 型で 9 種類の亜型に分類¹⁷⁾されている。近年は、A/H1N1 亜型、A/H3N2 亜型及び B 型の 3 種類のヒトインフルエンザウイルスが流行を繰り返していた。しかし 2009 年 4 月に、これまでの A/H1N1 株と抗原性が異なるブタ由来の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm)¹⁸⁾がメキシコ、北米を中心に発生し、その後日本を含む世界各地に感染が広がった。

現在認可されている抗インフルエンザ薬には、M2 イオンチャンネル阻害剤¹⁹⁾ (アマンタジン、リマンタジン) とノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤²⁰⁾ (オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル) の二種類がある。M2 イオンチャンネル阻害剤は A 型インフルエンザにのみ有効とされ、NA 阻害剤は A 型及び B 型インフルエンザに有効である。A/H1N1pdm 株は M2 オンチャンネル阻害剤に耐性であるため、WHO は A/H1N1pdm の治療薬として NA 阻害剤を推奨している²¹⁾。

世界各地で分離されている A/H1N1pdm 株のほとんどは、オセルタミビル及びザナミビルに対して感受性がある²²⁾ が、2009 年 6 月以降、NA タンパク質の 275 位のアミノ酸がヒスチジン (H) からチロシン (Y) に置換され、オセルタミビルに対し耐性能を有する A/H1N1pdm の出現が日本をはじめ世界各地から報告されている²³⁾。

わが国は世界のオセルタミビル生産量の 70%以上を使用しており、薬剤の選択圧による耐性株の出現が危惧されていた。また東京都においては、新型インフルエンザ対策の一環として抗インフルエンザ薬の備蓄を行っており^{24,25)}、オセルタミビル耐性ウイルスの流行状況の把握は、新型インフルエンザ対策の重要な課題となっている。

そこで、A/H1N1pdm におけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の高感度検出法を開発し、感染症発生動向調査等で搬入された検体から分離された A/H1N1pdm 株について調査を行った。

3-1. 材料及び方法

3-1-1. 供試材料及び供試材料からの RNA 抽出

2009/2010 シーズンに東京都で分離された A/H1N1pdm 株 546 株を対象とした。

A/H1N1pdm による細胞変性効果を生じた MDCK 細胞培養上清 200 μ L から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて遺伝子抽出を行い、RNA 抽出液 70 μ L を作製した。

3-1-2. RT-nested-PCR 法

NA タンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異部位を含む 362bp を増幅するプライマーを設定し、検出に用いた (Table 1.)。標的遺伝子の増幅は以下の手順で行った。RNA 抽出液 3 μ L, 1st PCR に使用するプライマー混合液 0.5 μ L 及び Omniscript RT Kit (QIAGEN)を用いて、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、cDNA 10 μ L を作製した。cDNA 作製後、10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa) 4.0 μ L, 2.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Mixture (TaKaRa) 4.0 μ L, 1st PCR プライマー混合液 0.5 μ L, 5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 31.25 μ L 及び cDNA 10 μ L を混合し、[94 $^{\circ}$ C1 分, 53 $^{\circ}$ C2 分, 72 $^{\circ}$ C2 分] のサイクルを 30 回繰り返した (1st PCR 反応)。その後、10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ L, 2.5 mM dNTP Mixture 4.0 μ L, 2nd PCR プライマー混合液 1.0 μ L, 5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 36.75 μ L 及び 1st PCR 産物 3.0 μ L を混合し、[94 $^{\circ}$ C1 分, 53 $^{\circ}$ C2 分, 72 $^{\circ}$ C2 分] のサイクルを 30 回繰り返した (2nd PCR 反応)。

3-1-3. ダイレクトシーケンス法

標的遺伝子が増幅された PCR 反応産物を 2.5%低融点ゲル (Nusieve GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し、紫外線照射下で特異バンドを切り出した。その後、ヒートブロックを用いて低融点ゲルを溶解し、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて低融点アガロースゲルから遺伝子精製を行い、DNA 液 30 μ L を得た。

シーケンシング反応には、2nd PCR 反応に用いたプライマーを使用し、各プライマー 3.2 μ M 1.0 μ L, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing 試薬 (ライフテクノロジーズジャパン) 4.0 μ L, 5 \times Buffer (ライフテクノロジーズジャパン) 2.0 μ L, 滅菌蒸留水 8.0 μ L 及び DNA 液 5.0 μ L を混合し、[94 $^{\circ}$ C15 秒, 50 $^{\circ}$ C15 秒, 60 $^{\circ}$ C4 分] のサイクルを 25 回繰り返した。

シーケンシング反応産物の精製は Centri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ドライアップ後、Hi-Di Formamide (ライフテクノロジーズジャパン) 25 μ L に再溶解し、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン) を用いて塩基配列を決定した。

3-1-4. 薬剤耐性変異の解析

得られた塩基配列を基に遺伝子解析ソフト MEGA4 を用いた系統樹解析²⁶⁾及びアミノ酸配列の比較を行った。NA 領域における薬剤耐性変異の有無については H275Y に加え、国立感染症研究所の報告²⁷⁾を参考に I223R を、Bloom ら²⁸⁾の報告を参考に R222Q, V234M を対象に調査を行った。

3-1-5. real-time PCR 法用標準 DNA の作製

real-time PCR 法用の標準 DNA として、NA タンパク質をコードする遺伝子領域に設定したプライマー及びプローブの塩基配列を含む合成鎖 DNA を作製した（ファスマックに合成依頼）。凍結乾燥品を TE 溶液（10 mM Tris-HCl, pH8.0 ; 1 mM EDTA, pH8.0）（ナカライテスク）で溶解後、10 倍段階希釈を行い、 3.0×10^6 copies/ μ L から 0.3 copies/ μ L までの 10 倍段階希釈系列を作製した。

3-1-6. real-time PCR 法

Chutinimitkul ら²⁹⁾や Bolotin ら³⁰⁾の報告を参考に、NA タンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異部位を検出するプライマー及び TaqMan MGB プローブを設定し、検出に用いた (Table 2-1.)。プライマー及びプローブの設定には、Primer Express v2.0（ライフテクノロジーズジャパン）を用いた。

標的遺伝子の検出は以下の手順で行った。RNA 抽出液（または標準 DNA 液）3 μ L, 各プライマー 100 μ M 0.25 μ L, 各プローブ 10 μ M 0.25 μ L 及び QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い反応量 25 μ L とし、50°C40 分、95°C15 分反応させた後、[94°C15 秒、60°C1 分 15 秒] のサイクルを 45 回繰り返した。なお検出機器として ABI fast-real time PCR 7900HT（ライフテクノロジーズジャパン）を使用した。

反応前後に蛍光強度の測定を行い、薬剤耐性変位の有無を判定した。

3-2. 結果及び考察

3-2-1. NA 遺伝子系統樹解析による薬剤耐性変異の解析

2009/2010 シーズンに都内で分離された A/H1N1pdm 株 546 株について NA 遺伝子の系統樹解析を行ったところ、2009/10 シーズンのワクチン株 (A/California/07/2009) と同じクラスターを構成し、545 株はさらに 4 つのグループに分かれた。1 株は 4 つのグループに属さず、大阪をはじめ海外で報告されているオセルタミビル耐性変異株と同じクラスターに分類された (Fig. 2-1)。

薬剤耐性変異の有無について調査したところ、解析した 546 株のうち系統樹解析によりオセルタミビル耐性変異株と同じクラスターに属した株 1 株 (0.2%) に H275Y の変異が認められた (Table 2-2)。H275Y に加え I223R の変異を持つ A/H1N1pdm 株の検出²⁷⁾や、H275Y に加え I223V の変異を持つ A/H1N1pdm 株の検出^{31,32)}も報告されている。今回 I223R, I223V の変異は認められなかったが、イソロイシン (I) からスレオニン (T) に変異している株 (I223T) が 1 株あった。さらに、Bloom ら²⁸⁾は、季節性インフルエンザ H1N1 株において H275Y に加えて R222Q, V234M のアミノ酸変異が起こった場合、ウイルスの増殖能が維持されると報告している。A/H1N1pdm 株の 222 位のアミノ酸はアルギニン (R) ではなくアスパラギン (N) であるが、すべての株でグルタミン (Q) への変異

はみられなかった。また、234位のアミノ酸がバリン (V) からアラニン (A) に変異している株 (V234A) は1株みられた。

国立感染症研究所が行った国内調査²⁷⁾によると、2009/10シーズンに H275Y アミノ酸変異が認められた分離株の検出頻度は 1.13%であった。国内調査に比べ都内分離株での検出頻度は 0.2%とやや低いが、国内調査には薬剤投与後に検体採取された症例や薬剤を投与したものの症状が改善しないなど臨床的に薬剤耐性が疑われたケースも含まれているため、国内調査の検出頻度は実際の検出頻度よりも少し高い数値である可能性がある。季節性インフルエンザ H1N1 株と同様、今後も耐性変異ウイルスが流行することも懸念されるため、継続的な調査の必要性が示唆された。

3-2-2. real-time PCR 法を用いた薬剤耐性変異の検出

real-time PCR 法の検出感度について、10 倍段階希釈した標準 DNA を用いて検討した結果、H275H 検出用及び H275Y 検出用とも 9.0×10^2 copies/tube から 9.0×10^6 copies/tube の範囲内において、サイクル数に比例し DNA 量の増幅曲線が得られ、検出感度はともに 9.0×10^2 copies/tube と推定された (Fig. 2-2)。

2009/10 シーズンに都内で分離された A/H1N1pdm 株のうち、RT-nested PCR 法—シーケンス法で H275Y のアミノ酸変異がみられた 1 株を含む A/H1N1pdm 株 116 株について real-time PCR 法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、感受性株 115 株はすべて感受性株と判定され、耐性変異株 1 株は耐性株と判定され、系統樹解析による結果と一致した (Fig. 2-3)。

real-time PCR 法を用いた薬剤耐性変異の検出は一度に多数検体の検出が可能であり、系統樹解析による薬剤耐性変異の解析よりも短時間で解析することができる。しかし、対象となる耐性変異の有無の判定しかできないため、新たな薬剤耐性変異部位が出現した場合には、改めて検出系の開発が必要となる。このため、系統樹解析による解析と併用していくことが望ましいと考えられる。

3-2-3. H275Y 薬剤耐性変異株

都内で分離された H275Y オセルタミビル耐性マーカーを有する A/H1N1pdm 分離株 (A/Tokyo/S09-1256/2009pdm) の薬剤感受性試験を国立感染症研究所で行った結果、都内で分離された A/H1N1pdm 分離株 (感受性株) に比べて 344 倍高い IC50 値を示し、オセルタミビルに対して耐性であることが確認された。また、ザナミビルに感受性であることも確認されている。検体採取はザナミビル投与前に行われており、オセルタミビル耐性能の獲得と薬剤投与との関係は不明である。

国立感染症研究所の報告²⁷⁾によると、2009/2010 シーズンに全国で分離された A/H1N1pdm 株のうち、H275Y オセルタミビル耐性マーカーを有する A/H1N1pdm 分離

株について、オセルタミビルに対する感受性試験を行った結果、感受性株に比べて平均で約 350 倍高い IC50 値を示し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低下していた。同じ耐性マーカーを有する季節性 A/H1N1 耐性株の IC50 値も感受性株に比べ 400 倍以上高い値であったと報告³³⁾されており、都内では臨床的に薬剤の服用が問題になった例がほとんどなかったことから、A/H1N1pdm 耐性株の薬剤感受性がどの程度のものなのか、今後フォローアップしていく必要がある。

東京都は、新型インフルエンザ対策として、400 万人分のオセルタミビル及びザナミビルの備蓄を行っている。これらの薬剤の有効性など今後の動向を探る上でも、都内で分離されたインフルエンザウイルスに対する薬剤耐性変異の調査は必要不可欠であり、今後も継続して行っていく必要があると考える。

4. 東京の無症候性キャリアから分離された SARS-CoV-2 の特徴

2019年12月以降、中国湖北省武漢でコロナウイルス感染症 (COVID-19) の症例数が増加している³⁴⁾。原因となる新しいコロナウイルス (2019-nCoV) が分離され、全ゲノム配列が決定され、SARS-CoV-2 と命名された³⁵⁾。日本では、2020年1月の時点で、COVID-19 の新規症例が確認され、中国からの帰国者や濃厚接触者から見つかった³⁶⁾。

東京都健康安全研究センターでは、国立感染症による検出マニュアルに示されたリアルタイム RT-PCR 法 (qRT-PCR 法)³⁷⁾ を含む核酸遺伝子ベースの方法を用いて、SARS-CoV-2 感染疑いの人または濃厚接触者の検査を開始した。

4-1. 材料及び方法

4-1-1. 供試材料

2020年1月に SARS-CoV-2 感染が疑われた中国からの旅行者や帰国者のうち、国立感染症研究所の検出マニュアルに記載された方法³⁸⁾で SARS-CoV-2 が検出された3名の咽頭ぬぐい液を解析の対象とした。

この研究は2013年のヘルシンキ宣言に従っており、東京都健康安全研究センターの倫理委員会によって承認され、実施した (受理番号: 健研健 2007 号)。

4-1-2. ウイルス分離試験

Vero 細胞及び VeroE6 細胞 (大阪府健康安全基盤研究所より分与) を用いて、ウイルス分離試験を行った。25cm² フラスコに単層培養した各細胞に咽頭ぬぐい液を接種し、2% FCS 添加イーグル MEM 培地 (日水製薬) を維持培地として、BSL3 内の培養器で、5% CO₂, 36°C の条件下で培養を行い、細胞変性効果 (CPE) の有無を確認した。

4-1-3. real-time PCR 法

Wuhan-Hu-1 (GenBank Accession No.:NC_045512) の orf1ab 領域及び核タンパク質 N 領域に Primer Express v3.02 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて、プライマー及び TaqMan MGB プローブを設定した (Table 3-1)。

標的遺伝子の検出は以下の手順で行った。RNA 抽出液 5μL, 各プライマー 100μM 0.25μL, 各プローブ 10μM 0.25μL 及び QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い反応量 25μL とし、50°C 30 分, 95°C 15 分反応させた後、[94°C 15 秒, 60°C 1 分 15 秒] のサイクルを 45 回繰り返した。なお検出機器として QuantStudio™ 12K Flex (サーモフィッシャーサイエンティフィック) または LightCycler480 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用した。

4-1-3. NGS 解析

NGS 解析には、QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) により抽出した RNA を用いた。NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を使用し、プロトコルに従いライブラリーの調製を行った。次世代シーケンサーは MiSeq (イルミナ) を用い、ゲノムデータ解析には、国立感染症研究所で入手可能な WEB 上の統合 NGS 解析ツール Virus Tap³⁹⁾ を利用した。

4-2. 結果と考察

4-2-1. ウイルス分離結果

3 検体中 1 検体で、検体接種の 3 日後に VeroE6 細胞で CPE が確認された。Vero 細胞では CPE が確認できなかったが、VeroE6 細胞及び Vero 細胞の培養上清から RNA を抽出し、orflab 領域と N 領域のリアルタイム PCR を実施したところ、いずれの培養上清からも SARS-CoV-2 遺伝子が検出され、培養上清中のウイルス力価は明らかに増加していた。翌 4 日後には、ウイルス力価はさらに増加しており、VeroE6 細胞よりも Vero 細胞の方が増加の幅が大きかった (Fig. 3-1)。

VeroE6 細胞の培養上清 300 μ L に 8%ホルムアルデヒド 50 μ L を加え、TecnaiTMG2 電子顕微鏡による観察を行った。ビリオンサイズ約 100nm のウイルス像が得られ、国立感染症研究所⁴⁰⁾において報告されているコロナウイルスの特徴的なエンベロープ構造を確認できた (Fig. 3-2)。

4-2-2. 臨床検体由来ウイルス及びウイルス分離株の遺伝子学的特徴

臨床検体由来ウイルスの RNA から直接 NGS 解析を行い、SARS-CoV-2 の全長配列の検出を試みたところ、1 検体から 37 のコンティグ (100~700bp フラグメント) が得られ、SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1 として知られている武漢海産物市場肺炎のウイルス株と一致した。NGS から SARS-CoV-2 のデータが得られたのは 3 検体中 1 検体だけで、No.1 セット (N) Ct 値 30.0, No.2 セット (N2) Ct 値 26.0 であった。この結果より、臨床検体から直接 NGS 解析を行うことが難しい場合があり、不明疾患などを対象に NGS 解析の手法を用いて網羅的な解析を行える状況は限られていることが示唆された。

CPE が見られた VeroE6 細胞の培養上清を用いて NGS 解析を行ったところ、全ゲノムシーケンス 29,903 塩基の配列が得られた (TKYE6182_2020 株, Genbank Accession No. LC529905)。このシーケンスを Genbank (NC_045512) 及び GISAID (EP_ILS_408665-408667, 408669, 407084) にすでに登録されている SARS-CoV-2 株と比較したところ、TKYE6182_2020 株のゲノムは、最初に公開された参照配列 (NC_045512) のゲノムと 3 塩基しか異なっておらず、日本の初期の分離株とは 1~8 塩基しか異なっていなかった (Fig. 3-3)。また、WuhanHu-1 (NC_045512) の 8,782 番目

及び 28,114 番目の配列の違いにより, SARS-CoV-2 ゲノムは2つの主要なタイプ (L 及び S) に分類⁴¹⁾されており, TKYE6182 株は L タイプであった. 我々が新たに分離した TKYE6182_2020 株は, 今後, 新しい遺伝子検査の評価, 抗ウイルス薬やワクチン開発に寄与できると考える.

5. 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)

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⁴²⁾。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⁴³⁾, 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^{44,45)}。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^{46,47)}。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⁴⁸⁾。

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。

5-1. 材料及び方法

5-1-1. 供試材料及び供試材料からの RNA 抽出

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) 及び 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。

5-1-2. 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 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PCR 反応条件は, 50°C 30 分, 95°C 15 分反応させた後, [94°C 15 秒, 60°C 1 分] のサイクルを 45 回繰り返した。

SARS-CoV-2 検出用のプライマー・プローブとして orflab-13215-F, orflab-13257-R, orflab-13238-P⁴⁹⁾, 及び NIID_2019-nCOV_N_F2, NIID_2019-nCOV_N_R2,

NIID_2019-nCoV_N_P2³⁹)をそれぞれ用いた。

5-1-3. 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、NGS を用いて SARS-CoV-2 の全長配列を決定した。臨床検体または Vero 系細胞を使用して分離培養したウイルス株を QIAmp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。NGS のライブラリー作製には 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。得られたデータの解析には CLC Genomic Workbench (CLC bio) を用い、トリミングした後に参照株 Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) へマッピングし、コンティグ配列を得た。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、Pop Art version 1.7⁵⁰) (フリーソフト) を用いて Median-joining 法による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 6.12.03⁵¹) (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。

5-2. 結果

5-2-1. 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、及び分離培養株 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 検体であった (35%)。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 株及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 4-1)。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 4-2)。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 4-3)。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。

5-2-2. 変異の探索

今回解析した全ての臨床検体及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及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 箇所にて特に変異が多く見られ (表 4-4), さらに、これらは同時に有している株が多かった。

5-2-3. 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 株及び 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~C) ごとにクラスターを形成した (図 4-1)。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。

5-2-4. ハプロネットワーク解析

全長を取得した全 58 株及び 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 4-2)。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 4-2) 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: 参照株及び 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, 各系統及び全株の Tajima's D は負の値を示した (表 4-5)。

5-3. 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⁵²⁾。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⁵²⁾。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、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。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 4-1)、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⁵³⁾。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⁵⁴⁾。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 4-2)。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 4-5)，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。

以上の系統樹解析及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。

6. 中等度から重度の COVID-19 患者からの尿の慎重な取り扱いについて

2019年12月以降, SARS-CoV-2によって引き起こされる COVID-19 が世界中に拡大した⁵⁵⁾. 上気道及び下気道の検体から定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を用いて SARS-CoV-2 を検出しているが, 血液, 糞便, 尿などの検体からも検出されている⁵⁶⁻⁵⁸⁾. また, 上気道・下気道検体及び糞便での SARS-CoV-2 ウイルス排出の期間について報告されているが^{49,59,60)}, 尿からの排泄に関するデータは限られている. そこで, COVID-19 の重症度と尿中の SARS-CoV-2 RNA の検出及び排泄持続時間の関係について調査した.

6-1. 材料及び方法

2020年2月7日から2020年3月24日まで, 東京都の三次医療機関である国立国際医療研究センターに入院し, 鼻腔拭いまたは咽頭拭い検体を用いた qRT-PCR によって COVID-19 と診断され患者⁶¹⁾を対象とした. 人口統計, 合併症, 疾患の重症度, COVID-19 の発症から尿検査までの日数に関する情報及び尿中の qRT-PCR の結果に関する情報 (サイクル閾値 [Ct] 値及びウイルス量 [VL] (ウイルスコピー/mL として)) を検討に用いた. 疾患の重症度を, 軽度: 酸素要求量のない患者, 中等度: 酸素要求量のある患者, 重度: 呼吸不全を治療するために人工呼吸器を必要とする患者と定義した. 研究方法は施設内審査委員会によって承認されており (承認番号: NCGM-G-003472-02), 各患者から書面によるインフォームドコンセントを得た.

6-2. 結果

20名の患者から23の検体が収集された (表 5-1). このコホートの年齢の中央値は 49.5 歳 (範囲: 21~83 歳) で, 90.4% が男性であった. 臨床経過により, 軽度 9 名 (45.0%), 中等度 8 名 (40.0%), 重度 3 名 (15.0%) に分類され, COVID-19 の発症から尿検査までの日数の中央値は 7 日だった (範囲: 2~28 日).

中等度の患者 1 名及び重度の患者 1 名の尿中から SARS-CoV-2 RNA が検出され, 軽度, 中等度, 重度の症例における尿中 SARS-CoV-2 RNA 陽性患者の割合は, それぞれ, 0/9 (0%), 1/8 (12.5%), 1/3 (33.3%) であった. 患者番号 12 (中程度) は, 最初の尿検査で SARS-CoV-2 RNA が検出されたが (Ct 値: 38.6, VL: 840copies / mL), 陽性結果の 3 日後は検出されなかった. 患者番号 19 (重症) は発症から病日 (ID) 7 に入院し, 尿中の SARS-CoV-2 RNA が検出された (Ct 値: 38.7, VL: 800 コピー / mL). ID 9 で重度の肺機能障害を発症し, 人工呼吸器や体外式膜型人工呼吸器などの集中治療が必要となった. ID11 でも尿中 SARS-CoV-2 RNA が検出され (Ct 値: 40.6, VL: 254 コピー / mL), ID 15 では, 継続的な腎代替療法が必要となった. ID17 の尿では SARS-CoV-2 RNA は検出されず, ID45 で死亡した.

6-3. 考察

研究期間中、20名の患者のうち2名(10%)の尿からSARS-CoV-2 RNAが検出された。尿中のSARS-CoV-2 RNAに関する報告は2つだけで^{56,57)}、1つの研究では、ウイルスは9人中1人の患者(11.1%)で検出され⁵⁶⁾、別の研究では、72名の患者の尿検体を調べたが、SARS-CoV-2 RNAが陽性となった患者はいなかった⁵⁷⁾。これらの研究では、対象となった患者の疾患の重症度は評価されなかったが、我々はSARS-CoV-2 RNAが陽性であった患者の疾患の重症度を評価した。軽度の患者の尿からは、SARS-CoV-2 RNAは検出されなかったが、中等度及び重度のグループのそれぞれ1名の患者では、尿からSARS-CoV-2 RNAが検出された。SARS-CoV-2 RNAが少なくとも4日間尿中に排泄される可能性があることが示されたが、この期間は、咽頭拭い液(最大30日)や糞便(14~18日)などに比べると比較的短かった⁵⁸⁻⁶⁰⁾。医療従事者間のCOVID-19感染は世界中で大きな問題になっている⁶¹⁾。今回の結果から、医療従事者は中等度から重度の疾患の患者からの尿サンプルを注意深く取り扱う必要が示唆された。

今回の検討では、登録された患者数が少ないため、臨床的重症度と尿中のSARS-CoV-2 RNA検出との関係を確立できませんでした。また、尿中のウイルスの感染性について評価しなかった。しかし、尿から分離されたSARS-CoV-2の感染性がある可能性が示されており⁶²⁾、尿細管上皮の直接感染を示唆する剖検例も報告されている⁶³⁾。

結論として、我々の結果から、SARS-CoV-2 RNAがCOVID-19の重症度に応じて尿中に排泄される可能性があることが示された。また、尿中のウイルス排出の期間は比較的短いですが、医療従事者は、特に中等度から重度のCOVID-19の患者からのサンプルである、ヘンハンドリング尿の感染予防及び管理措置を講じる必要が示唆された。

7. 総括

本研究では、主にリアルタイム PCR 法等を用い、ヒトに病原性を示すウイルスの検出に焦点を絞り、HSV-1/2 検査法、薬剤耐性インフルエンザウイルス検査法、COVID-19 検査法等を開発した。これらの手法により、性器ヘルペスにおける HSV-1/2 の鑑別と調査、オセルタミビル耐性ウイルスの迅速検査と調査、さらに高感度な SARS-CoV-2 検査法の構築を行った。

まず、HSV-1/2 の型別かつウイルス定量が可能な迅速検査法の構築し、これまで HSV-2 感染が多いとされてきた性器ヘルペスで、東京都においては HSV-1 が検出される割合が高くなっていることを明らかにした。

次に、インフルエンザの AH1N1pdm09 について、オセルタミビル（タミフル）耐性ウイルスの迅速検査法を構築し、東京都内での薬剤耐性ウイルスの浸淫状況を明らかにした。また、AH1N1pdm09 で構築した系を応用し、AH3N2 亜型、B 型の薬剤耐性検出系を開発し、さらにパロキサビルマルボキシル耐性変異の検出系を構築し、東京都内における薬剤耐性インフルエンザウイルスのモニタリングに使用し、年に数株の耐性ウイルスを検出している。

さらに、新型コロナウイルス（COVID-19）の原因ウイルスである SARS-CoV-2 の迅速検査法の構築を目的として、高感度な real-time PCR 法の開発を行い、重症患者の尿から SARS-CoV-2 が検出されることを明らかにした。また、SARS-CoV-2 検出法の一つとして、東京都における日常の行政検査で使用している。我々が分離した TKYE6182_2020 株の一部は、大学等の研究機関にも分与し、試験開発の一助となっている。その後も継続してウイルス分離・分子系統樹解析を行い、S タイプや感染性の強いタイプとされる D614G 変異保有タイプのウイルスを分離・解析し、流行株のモニタリングを行っている。

以上のように、また、本研究で開発した方法は、既に東京都における行政検査や調査で利用されている。

8. 今後の課題

新興再興感染症の発生や新型ウイルスや薬剤耐性ウイルスの出現・流行など、感染症の脅威はとどまるところを知らない。このような情勢の中、医学・公衆衛生に携わる者としてできることは、早期に検出系を立ち上げ患者を医療へつなげること、病原体の解析を行い研究開発の一翼を担うことと考える。医療人として、感染症の脅威に立ち向かうべく、日々の精進が必要であると考えます。

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導とご高配を賜りました北里大学大学院 医療系研究科 生体制御生化学 石井直仁教授に厚くお礼申し上げます。

終始あたたかいご指導とご助言をくださいました東京都健康安全研究センター 微生物部長 貞升健志博士に深く感謝申し上げます。

10. 引用文献

1. 地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所：病原体検出マニュアル。性器ヘルペス 2004;1256-71.
2. 地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所：急性脳炎。病原体検出マニュアル 2004;1289-93.
3. 地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所：無菌性髄膜炎。病原体検出マニュアル 2004;1345-68.
4. Mitchell PS, Espycentral MJ, Smith TF, toal DR, Rys PN, Berbari EF, et al.: Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol 1997;35:2873-7.
5. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, KoureaKeremastinou J: Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2001;39:4426-32.
6. 田部井由紀子, 貞升健志, 吉田靖子, 長谷川道弥, 佐々木由紀子, 平田一郎, 他：臨床試料からのウイルス遺伝子検出。東京衛研年報 1998;49:17-22.
7. 新開敬行, 貞升健志, 長谷川道弥, 田部井由紀子, 長島真美, 吉田靖子, 他：重症急性呼吸器症候群 (SARS) 診断のための遺伝子検査法の確立。東京健安研七年报 2004;55:25-9.
8. 貞升健志, 新開敬行, 長島真美, 吉田靖子, 山田澄夫：高病原性鳥インフルエンザ診断のための遺伝子検査システムの確立。東京健安研七年报 2006;57:59-64.
9. Schmutzhard J, Ridel HM, Wirgart BZ, Grillner L: Detection herpes simplex virus type 2 and zarcicella-zoster virus in skin legions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. J Clin Virol 2004;29:120-6.
10. Issa NC, Espy MJ, Uhl JR, Smith TF: Sequencing and resolution of amplified herpes simplex virus DNA with intermediate melting curves as genotype 1 or 2 by LightCycler PCR assay. J Clin Microbiol 2005;43:1843-5.

11. Corey L, Huang ML, Selke S, Wald A: Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time Taqman PCR assay. *J. Med. Virol.* 2005;76:350-5.
12. Namvar L, Olofsson S, Bergstrom T, Lindh M : Detection and typing of herpes simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2005;43:2058-64.
13. Afonso N, Gunasena S, Galla K, Podozorski R, Chandrasekar P, Alangaden G: Appropriate use of polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus 2 in cerebrospinal fluid of patients at an inner-city hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 57;3:309-13.
14. 菅生元康 : STD としてのヘルペスウイルス感染症. *臨床と研究* 2005;82:1496-500.
15. Kawada J, Kimura H, Ito Y, Hoshino Y, TanakaKitajima N, Ando Y, et al.: Comparison of realtime and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol. Immunol* 2004;48:411-5.
16. Kimura H, Ito Y, Futamura M, Ando Y, Yabuta Y, Hoshino Y, et al.: Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2. *J Med Virol* 2002;67 : 349-53.
17. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al.: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* 2005;79: 2814-22.
18. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al.: Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 2009;459:1122-6.
19. Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, et al.: ANTIVIRAL ACTIVITY OF 1-ADAMANTANAMINE (AMANTADINE). *Science.* 1964;144(3620):862-3.
20. Hayden FG: Perspectives on antiviral use during pandemic influenza. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:1877-84.
21. WHO: WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses,
http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

22. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al.: Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325:197-201.
23. 国立感染症研究所：オセルタミビル耐性新型インフルエンザウイルス AH1pdm の検出—大阪府. 病原微生物検出情報 2009;30:270.
24. 東京都：東京都新型インフルエンザ対策行動計画,
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/iryo/kansen/influenza/files/influ.pdf>
(2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
25. 東京都：新型インフルエンザ対応マニュアル,
http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/iryo/kansen/influenza/files/influ_manyual.pdf (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
26. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007;24:1596-9.
27. 国立感染症研究所：新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報]. 病原微生物検出情報 2010;31:173-8.
28. Bloom JD, Gong LI, Baltimore D: Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science*. 2010;328:1272-5.
29. Chutinimitkul S, Suwannakarn K, Chieochansin T, Mai LQ, Damrongwatanapokin S, Chaisinghet A, et al.: H5N1 Oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TaqMan probes. *J Virol. Methods*. 2007;139:44-9.
30. Bolotin S, Robertson AV, Eshaghi A, Lima CD, Lombos E, Chong-King E, et al.: *J Virol. Methods*. 2009;158:190-4.
31. Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimovet AI, et al.: Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicro. Agents Chemother*. 2010;54:1102-10.
32. CDC: "Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Infection in Two Summer Campers Receiving Prophylaxis – North Carolina, 2009", *MMWR*. 2009;58:969-72.
33. 国立感染症研究所：2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報]. 病原微生物検出情報. 2009;30:101-6.

34. Du Z, Wang L, Cauchemez S, Xu X, Wang X, Cowling BJ, et al.: Risk for Transportation of 2019 novel coronavirus disease from Wuhan to other cities in China. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(5):1049-52.
35. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses: The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5(4):536-44.
36. The Ministry of Health, Labour and Welfare. About Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Available at <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/newpage_00032.html>Accessed March 10, 2020
37. The National Institute of Infectious Diseases. Pathogen Detection Manual (New Coronavirus Infection), National Institute of Infectious Diseases, February 2020, Available at <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class0>>Accessed March 10, 2020.
38. Shirato K, Nao N, Katano H, Takayama I, Saito S, Kato F, et al., Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan, *Jpn J Infect Dis.* 2020;73(4):304-7.
39. Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M: VirusTAP: Viral genome-targeted assembly pipeline. 2016;7:32.
40. The National Institute of Infectious Diseases. New coronavirus: Successful isolation with cells developed by the National Institute of Infectious Diseases, Available at <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/9369-2020-virology-s1.html>> Accessed March 10, 2020.
41. Tang X, Wu C, Li X, et al., On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2, *National Science Review*, nwa036, Available at <<https://doi.org/10.1093/nsr/nwa036>> Accessed March 10, 2020.
42. 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)
43. 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. (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)
<https://www.bousai.metro.tokyo.lg.jp/taisaku/saigai/1007261/1007327.html>

44. Yu WB, Tang GD, Zhang L, Corlett RT: Decoding the evolution and transmissions of the novel pneumonia coronavirus (SARS-CoV-2 / HCoV-19) using whole genomic data. *Zool Res.* 2020; 41(3):247-57.
45. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al.: On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review* 2020;7(6):1012-3.
46. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M: Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(17):9241-3.
47. Gudbjartsson DF, Helgason A, Jonsson H, Magnusson OT, Melsted P, Norddahl GL, et al.: Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population. *N Engl J Med.* 2020;382:2302-15.
48. 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)
49. Nagashima M, Kumagai R, Yoshida I, Kawakami M, Nagano M, Asakura H, et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.* 2020;73:320-2.
50. Leigh JW, Bryant D: POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 2015;6: 1110-6.
51. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Sebastián E Ramos-Onsins SE, et al.: DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34:3299-302.
52. 齊木 大, 日向綾子, 千葉隆司, 久保田寛顕, 鈴木康規, 吉田 勲, 他: 国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析. *東京健安研セ年報* 2017;68:55-9.
53. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al.: *Cell.* 2020;182(4):812-27.
54. Koyama T, Weeraratne D, Snowdon JL, Parida L: Emergence of Drift Variants That May Affect COVID-19 Vaccine Development and Antibody Treatment. *Pathogens.* 2020;9(5):324.
55. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al.: A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New Engl J Med.* 2020;382:727-33.
56. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al.: SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol.* 2020;92(9):1676-80.
57. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al.: Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020;323:1843-4.

58. Hosoda t, Sakamoto M, Shimizu H, Okabe N. SARS-CoV-2 enterocolitis with persisting to excrete the virus for approximately two weeks after recovering from diarrhea: a case report. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020;41(6):753-4.
59. Hu Y, Shen l, Yao Y, Xu Z, Zhou J, Zhou H. A report of three COVID-19 cases with prolonged viral RNA detection in anal swabs. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(6):786-7.
60. Zou B, She J, Wang y, Ma X: Duration of viral shedding of discharged patients with sever COVID19. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2240-2.
61. CDC COVID-19 Response Team. Characteristics of health care personal with COVID-19 - United States, February 12-April 9,2020. Centers for disease control and prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69:477-481.
62. Sun J, Zhu A, Li H, Zheng K, Zhuang Z, Chen Z, et al.: Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):991-3.
63. Farkash EA, Wilson AM, Jentzen JM.: Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(8):1683-7.

11. 業績目録

(I) 原著

1. 長島真美, 河上麻美代, 熊谷遼太, 浅倉弘幸, 永野美由紀, 北村有里恵, 加來英美子, 矢尾板優, 長谷川道弥, 小田真悠子, 市川めぐみ, 千葉隆司, 小西浩之, 貞升健志, 石井良和: 東京都衛生検査所精度管理調査における病原体核酸検査の調査結果 (2019年度).
東京都健康安全研究センター研究年報 in press
- 2. 浅倉弘幸, 長島真美, 熊谷遼太, 吉田 勲, 長谷川乃映瑠, 長谷川道弥, 藤原卓士, 林 真輝, 永野美由紀, 山崎貴子, 河上麻美代, 北村有里恵, 加來英美子, 矢尾板優, 森 功次, 内田悠太, 原田幸子, 鈴木 愛, 粕谷 文, 小杉知宏, 林 志直, 千葉隆司, 貞升健志: 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).
東京都健康安全研究センター研究年報 in press
- ◎ 3. Nagashima M, Kumagai R, Yoshida I, Kawakami M, Nagano M, Asakura H, Kaku E, Kitamura Y, Hasegawa M, Hayashi Y, Chiba T, Sadamasu K, Yoshimura K. : Characteristics of SARS-CoV-2 Isolated from Asymptomatic Carrier in Tokyo
Jpn J Infect Dis. 73,320–322,2020 【IF:1.24】

- 4. Nomoto H, Ihikane M, Katagiri D, Kinoshita N, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ohmagari N. : Cautious handling of urine from moderate to severe COVID-19 patients
Am J Infect Control. 2020 Aug;48(8):969-971.
doi: 10.1016/j.ajic.2020.05.034. 【IF:2.294】
5. Nagashima M, Kumagai R, Kitamura Y, Matsuoka S, Imamura A, Chiba T, Sadamasu K. : Examination of Efficient HIV Confirmatory Testing Protocols Using an HIV-1/2 Antibody Differentiation Assay
Jpn J Infect Dis. 73,173–175,2020. 【IF:1.24】
6. Yanagawa Y, Nagashima M, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S, Yokoyama K, Shinkai T, Sadamasu K, Watanabe K. : Seroprevalence of Entamoeba histolytica at a voluntary counselling and testing centre in Tokyo: a cross-sectional study
BMJ Open 2020;10:e031605. doi:10.1136/bmjopen-2019-031605 【IF:2.376】
7. Matsuoka S, Nagashima M, Sadamasu K, Mori H, Kawahata T, Zaitso S, Nakamura A, de Souza MS, Matano T. : Estimating HIV-1 incidence in Japan from the proportion of recent infections
Preventive Medicine Reports, 2019 Oct 21;16:100994.
doi: 10.1016/j.pmedr.2019.100994. eCollection 2019 Dec. 【IF:2.400】
8. 熊谷遼太, 長島真美, 根岸あかね, 河上麻美代, 北村有里恵, 加來英美子, 浅倉弘幸, 永野美由紀, 矢尾板優, 長谷川道弥, 林 志直, 平田俊吉, 藤田 仁, 正木忠明, 小柳英樹, 橋本倫太郎, 加藤隆司, 牧田郁夫, 沼口俊介, 和田紀之, 松永貞一, 千葉友幸, 星野 誠, 鈴木洋, 清水伸泰, 林 泉彦, 加地はるみ, 五十嵐弥生, 宮田章子, 黒澤サト子, 松岡典子, 三浦麻子, 鈴木昌和, 深堀俊彦, 城所功文, 佐藤和子, 北條 稔, 古畑 正, 塩崎正英, 加茂 隆, 天木 聡, 川邊敏之, 山上恵一, 片平潤一, 田中光彦, 成田雅弘, 柏田和子, 山口規夫, 新開敬行, 千葉隆司, 貞升健志 : A 型インフルエンザウイルスにおけるバロキサピルマルボキシル耐性遺伝子変異検出法の検討及び臨床検体への応用.
東京都健康安全研究センター研究年報, 70,33-38,2019.
9. 浅倉弘幸, 永野美由紀, 矢尾板優, 長島真美, 原田幸子, 小田真悠子, 林 志直, 長谷川道弥, 根岸あかね, 熊谷遼太, 河上麻美代, 北村有里恵, 加來英美子, 宗村佳子, 新開敬行, 千葉隆司, 貞升健志 : 東京都内における A 型肝炎ウイルスの検出状況と亜型分類.
東京都健康安全研究センター研究年報, 70,51-56,2019.

10. 浅倉弘幸, 永野美由紀, 長島真美, 矢尾板優, 林 志直, 長谷川道弥, 根岸あかね, 熊谷遼太, 河上麻美代, 北村有里恵, 加來英美子, 宗村佳子, 新開敬行, 千葉隆司, 貞升健志: 感染症発生動向調査における胃腸炎起因ウイルスの検出状況 (2017年度~2018年度).
東京都健康安全研究センター研究年報, 70,57-61,2019.
11. 永野美由紀, 浅倉弘幸, 長島真美, 矢尾板優, 林 志直, 長谷川道弥, 根岸あかね, 熊谷遼太, 河上麻美代, 北村有里恵, 加來英美子, 小田真悠子, 宗村佳子, 新開敬行, 千葉隆司, 貞升健志: 東京都内で検出されたノロウイルスの分子疫学解析 (2017年度~2018年度).
東京都健康安全研究センター研究年報, 70,63-67,2019.
12. 新開敬行, 長谷川道弥, 井口智義, 畠山 薫, 河村真保, 千葉隆司, 岡崎輝江, 齊木 大, 鈴木 愛, 村田理恵, 吉田 勲, 長島真美, 大久保智子, 田部井由紀子, 武藤千恵子, 山本和興, 小杉有希, 高橋久美子, 五十嵐剛, 石上 武, 辻 麻美, 渡邊喜美代, 播田實千恵子, 高橋佳代子, 小林 巧, 大川将司, 神門幸大, 日向綾子, 岩本百合子, 鈴木 良, 山梨敬子, 小西典子, 森 功次, 門間千枝, 尾畑浩魅, 赤瀬 悟, 原田幸子, 奥野ルミ, 内谷友美, 久保田寛顕, 加藤 玲, 上原さとみ, 鈴木康規, 小林真紀子, 高橋由美, 石塚理恵, 井田美樹, 下島優香子, 栗田さや子, 小西浩之, 秋場哲哉, 横山敬子, 平井昭彦, 守安貴子, 貞升健志: 国内流行が危惧される感染症の検査及び分子疫学解析に関する研究.
東京都健康安全研究センター研究年報, 69,25-35,2018.
13. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 鈴木 愛, 内田悠太, 長谷川道弥, 長島真美, 森 功次, 高橋久美子, 井口智義, 小西浩之, 新開敬行, 貞升健志: 東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検索 (2017年度).
東京都健康安全研究センター研究年報 69,65-69,2018.
14. 北村有里恵, 長島真美, 吉田 勲, 根岸あかね, 熊谷遼太, 加來英美子, 林 志直, 千葉隆司, 秋場哲哉, 新開敬行, 貞升健志: 東京都内インフルエンザ流行状況の把握を目的としたツイート数の有用性の検討.
東京都健康安全研究センター研究年報 68,65-69,2017.
15. 齊木 大, 日向綾子, 千葉隆司, 久保田寛顕, 鈴木康規, 吉田 勲, 岡崎輝江, 長谷川道弥, 長島真美, 根岸あかね, 鈴木 愛, 栗田さや子, 中山愛子, 平井昭彦, 秋場哲哉, 新開敬行, 黒田 誠, 貞升健志: 国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析.
東京都健康安全研究センター研究年報 68,55-59,2017.

16. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 北村有里恵, 熊谷遼太, 長島真美, 高橋久美子, 井口智義, 小西浩之, 新開敬行, 貞升健志: 東京都内山間部において採取したマダニ類における病原微生物の検索 (2016 年度).
東京都健康安全研究センター研究年報, 68,61-64,2017.
17. 吉田 勲, 加來英美子, 根岸あかね, 神門幸大, 北村友里恵, 長島真美, 新開敬行, 秋場哲哉, 貞升健志: 東京都山間部で 2005 年に採取されたダニ類における病原微生物の検索.
東京都健康安全研究センター年報, 67, 75-78, 2016
18. 齊木 大, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 鈴木 愛, 小田真悠子, 角田徳子, 村内このみ, 柴崎澄枝, 長島真美, 吉田 勲, 原田幸子, 根岸あかね, 宗村佳子, 森 功次, 永野美由紀, 木本佳那, 林 志直, 鈴木康規, 小林真紀子, 西野由香里, 福井理恵, 千葉隆司, 新開敬行, 平井昭彦, 秋場哲哉, 貞升健志: 平成 26 年に都内で発生した Dengue 熱に関する Dengue ウイルス媒介蚊ならびに Dengue ウイルス検査対応 (平成 26 年度及び 27 年度の結果) 2. Dengue ウイルス検査対応.
東京都健康安全研究センター年報, 67,27-35,2016.
19. 長島真美, 北村有里恵, 秋場哲哉, 貞升健志, 堅田敦子, 白井久美子: 東京都の HIV 感染者・AIDS 患者の動向.
病原微生物検出状況, 37,3-5,2016.
20. Ogawa S, Hachiya A, Hosaka M, Matsuda M, Ode H, Shigemi U, Okazaki R, Sadamasu K, Nagashima M, Toyokawa T, Tateyama M, Tanaka Y, Sugiura W, Yokomaku Y, Iwatani Y. : A Novel Drug-Resistant HIV-1 Circulating Recombinant Form CRF76_01B Identified by Near Full-Length Genome Analysis.
AIDS Res Hum Retroviruses. 32, 284-289, 2016 [IF:1.805]
21. 貞升健志, 向川 純, 長島真美, 森 功次, 千葉隆司, 山本宣和, 吉田 勲, 原田幸子, 宗村佳子, 永野美由紀, 木本佳那, 高橋由美, 林 志直, 甲斐明美, 新開敬行, 秋場哲哉, 平井昭彦: 分子疫学的手法を用いた有害微生物の疫学解析に関する研究.
東京都健康安全研究センター研究年報, 66,13-21,2015.
22. 長島真美, 北村有里恵, 原田幸子, 吉田 勲, 根岸あかね, 猪又英美子, 秋場哲哉, 貞升健志: 東京都感染症流行予測調査事業におけるヒトパピローマウイルス及び水痘ウイルス抗体調査成績 (2014 年度).
東京都健康安全研究センター年報, 66, 85-89, 2015
23. 三宅啓文, 島田信子, 高野弘紀, 長島真美, 宮川明子, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都内の HIV 検査陽性例における梅毒・クラミジア抗体検査成績.
東京都健康安全研究センター年報, 64,41-45,2013.

24. 長島真美, 宮川明子, 新開敬行, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都における HIV 検査数と陽性例の解析.
病原微生物検出状況, 34,254-255,2013.
25. 川畑拓也, 長島真美, 貞升健志, 小島洋子, 森 治代: HIV 急性感染期の診断における第 4 世代迅速検査試薬の性能評価.
感染症誌, 87,431-434,2013.
26. 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田 勲, 原田幸子, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: Real-time PCR を用いたヒトパピローマウイルス 6 型及び 11 型遺伝子の検出.
東京都健康安全研究センター年報, 63,97-102,2012.
27. 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田 勲, 原田幸子, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都健康安全研究センターにおける HIV 検査成績 (2005-2010 年).
東京都健康安全研究センター年報, 62,65-69,2011.
28. 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 吉田 勲, 尾形和恵, 長谷川道弥, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出.
東京都健康安全研究センター年報, 62,57-63,2011.
- 29. 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 高野智香, 塚本良治, 尾形和恵, 吉田 勲, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 林 志直, 貞升健志, 甲斐明美: 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm2009 におけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出.
東京都健康安全研究センター年報, 61,121-126,2010.
30. Hattori J., Shiino T., Gatanaga,H., Yoshida,S., Watanabe D., Minami R., Sadamasu,K., Kondo M., Mori,H., Ueda,M., Tateyama,M., Ueda A., Kato S., Ito T., Oie M., Takata N., Hayashida T., Nagashima M., Matsuda M., Ibe S., Ota Y., Sasaki S., Ishigatubo Y., Tanabe Y., Koga I., Kojima Y., Yamamoto M., Fujita J., Yokomaku Y., Koike T., Shirasaka,T., Oka S. and Sugiura W.: Trend in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan, *Antiviral Res.* 88,72-79,2010. 【IF:4.101】
31. 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 尾形和恵, 吉田 勲, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 保坂三継, 貞升健志, 甲斐明美: 季節性インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出 (2007/08, 2008/09 シーズン).
東京都健康安全研究センター年報, 60,61-66,2009.

32. 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 仲真晶子, 矢野一好: 東京都における 2007 年 HIV 検査陽性例の遺伝子学的, 血清学的解析.
日本エイズ学会誌, 11,27-33,2009.
33. 貞升健志, 新開敬行, 長島真美, 尾形和恵, 吉田靖子, 山田澄夫, 矢野一好: 鳥インフルエンザ診断のための遺伝子検査システムの確立.
化学生物総合管理, 4,4-16,2008.
34. 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好: ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症: 東京都における検査と解析.
東京都健康安全研究センター年報, 58,27-36,2007.
35. 長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好: 感染症発生動向調査におけるヒトパピローマウイルスの検出.
東京都健康安全研究センター年報, 58,63-66,2007.
36. 新開敬行, 貞升健志, 長島真美, 尾形和恵, 吉田靖子, 矢野一好, 天木 聡, 柏田和子, 加藤隆司, 片平潤一, 加茂 隆, 城所功文, 塩崎正英, 鈴木昌和, 田中光彦, 平田俊吉, 北条 稔, 松永貞一, 山上恵一, 山口規夫: 病原体定点医療機関における 2006/2007 シーズンのインフルエンザウイルス検出状況.
東京都健康安全研究センター年報, 58,67-72,2007.
- 37. 長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫: 単純ヘルペス 1 型及び 2 型ウイルス検査のための Multiplex Real-time PCR 法の開発.
感染症誌, 81,549-554,2007.
38. 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史郎, 浅黄 司, 伊藤俊宏, 吉田 繁, 小池隆夫, 大家正泰, 渡邊香奈子, 正兼亜季, 上田幹夫, 瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志, 長島真美, 岡田清美, 近藤真規子, 秦 眞美, 溝上泰司, 森 治代, 南 留美, 白坂琢磨, 岡 慎一, 杉浦 互, 金田次弘: 日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ.
日本エイズ学会誌, 9,136-146,2007.

39. Fujisaki,S., Fujisaki,S., Ibe,S., Asagi,T., Itoh,T., Yoshida,S., Koike,T., Oie,M., Kondo,M., Sadamasu,K., Nagashima,M., Gatanaga,H., Matsuda,M., Ueda,M., Masakane,A., Hata,M., Mizogami, Y., Mori,H., Minami,R., Okada,K., Watanabe,K., Shirasaka,T., Oka,S., Sugiura,W. and Kaneda,T.:Performance and quality assurance of genotype drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan, *Jpn.J.Infect.Dis.*,60,60,113-117,2007. 【IF:1.24】
40. Gatanaga,H., Ibe,S., Matsuda,M., Yoshida,S., Asagi,T., Kondo,M., Sadamasu,K., Tsukada,H., Masakane,A., Mori,H.,Takata,N., Minami,R., Tateyama,M., Koike,T., Itoh,T., Imai,M., Nagashima,M., Fumitake,G., Ueda,M., Hamaguchi,M., Kojima,Y., Shirasaka,T., Kimura,A., Yamamoto,M., Fujita,J., Oka,S. and Sugiura,W.:Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan, *Antiviral Res.*,75,75-82,2007. 【IF:4.101】
41. Sasaki,Y., Kai,A., Hayashi,Y., Shinkai,T., Noguchi,Y., Hasegawa,M., Sadamasu,K., Mori,K., Tabei,Y., Nagashima,M., Morozumi,S. and Yamamoto,T.: Multiple viral infections and genomic divergence among noroviruses during an outbreak of acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol.*44,790-797,2006. 【IF:5.897】
42. 貞升健志, 新開敬行, 長島真美, 吉田靖子, 山田澄夫:高病原性鳥インフルエンザ診断のための遺伝子検査システムの確立.
東京都健康安全研究センター年報, 57,59-64,2006.
43. 長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫:ヒトパピローマウイルス遺伝子検出の multiplex 化.
東京都健康安全研究センター年報, 57,65-68,2006.

(II) 著書
なし

(III) 総説・講座
なし

(IV) 症例・臨床治験・その他
なし

12. 図表

Table 1-1 Primer Pairs and Fluorogenic probe Probes used for Real-time PCR and Conventional PCR

Assay	Primer or Probe	Sequence (5'→3')
Real-time PCR	HSV1-F	GGG CCG TGA TTT TGT TTG TC
	HSV1-R	CCG CCA AGG CAT ATT TGC
	HSV1-Probe	FAM-TAG TGG GCC TCC ATG GG-MGB
	HSV2-F	GCT GCA TTG CGA ACG ACT AG
	HSV2-R	CGC CGG AGG TCAAAC G
	HSV2-Probe	VIC-TTT TTC GTG TGC ATC GCG-MGB
Conventional PCR ^{*1}	HS12	GCC GCG AAA GCG ATT GGG
	HS13	GTT AGG GAG TTG TTC GGT CAT AAG CT

*1 : Tabel Y, et al ⁹⁾

Table 1-2 Comparison between the Sensitivity of Real-time PCR and Conventional PCR Assay in Detecting of HSV DNA

Strain	HSV-1 (03-185/Tokyo ^{1*})							HSV-2 (MS ^{2*})						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Real-time PCR	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Conventional PCR	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

*1 : 03-185/Tokyo; 1.4×10^7 copies/tube

*2 : MS; 3.8×10^5 copies/tube

*3 : DNA solution extracted from each HSV strain was 10-fold diluted by sterilized distilled water

Table 1-3 Comparison between the Sensitivity of Single Real-time PCR and Multiplex Real-time PCR Assay

Real-time PCR	primer pair probe	maximum 10-fold dilutions	
		HSV-1 strain ^{*1}	HSV-2 strain ^{*2}
single	HSV1-F/R HSV1-Probe (FAM)	10 ⁻⁶	ND ^{*3}
	HSV2-F/R HSV2-Probe (VIC)	ND	10 ⁻⁵
multiplex	HSV1-F/R & HSV2-F/R HSV1-Probe & HSV2-Probe (FAM) (VIC)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵

*1 : 03-185/Tokyo; 1.4×10^7 copies/tube

*2 : MS; 3.8×10^5 copies/tube

*3 : not detected

Table 2-1 Primer Pairs and Fluorogenetic Probes used for Conventional PCR and Real-time PCR

		Name	Sequence(5'→3')									
Conventional PCR	RT/1st	swNA1-1	AgA	CAA	Tgg	AgC	AgT	ggC	Tg			
		swNA1-2	ACg	ACA	CTg	gAT	TAC	AAC	Tg			
	2nd	swNA1-3a	TAA	AgT	ACA	ACg	gCA	TAA	TAA	CAg		
		swNA1-4	Tgg	ATT	gTC	TCC	gAA	AAT				
Real-time PCR		swNA-F4	AAg	ATA	gTC	AAA	TCA	gTC	gAA	ATg	AAT	g
		swNA-R4	CAC	TAg	AAT	CAG	gAT	AAC	Agg	AgC	AT	
		swNA-H4P	FAM-	CTC	ATA	gTg	ATA	ATT	-	MGB		
		swNA-Y4P	VIC-	CCT	CAT	AgT	AAT	AAT	TAg	g-MGB		

Table 2-2 Oseltamivir Resistance Related Mutations of the Viruses isolated in Tokyo

NA Mutation	Positive Number / Total Number	(%)
H275Y	1/546	0.2%
I223R	0/546	0.0%
(I223V)	(0/546)	0.0%
(I223T)	(1/546)	0.2%
(N222Q)	(0/546)	0.0%
(V234A)	(1/546)	0.2%

Table 3-1 Primer Pairs and Fluorogenetic Probes used for Real-time PCR

Region	Name	Sequence(5'→3')							
orflab	orflab-13215-F	CCg	gAA	gCC	AAT	ATg	gAT	CA	
	orflab-13257-R	gCA	ACg	gCA	gTA	CAG	ACA	ACA	
	orflab-13238-Probe	FAM-	ATC	CTT	Tgg	Tgg	TgC	ATC	-MGB
N	N-28336-F	CgT	TTg	gTg	gAC	CCT	CAG	A	
	N-28374-R	CCC	CAC	TgC	gTT	CTC	CAT	T	
	N-28356-Probe	VIC-	TCA	ACT	ggC	AgT	AAC	C-MGB	

Table 4-1 SARS-CoV-2全長配列解析の系統樹解析に用いた検体

検体名	検体種	検名	Accession No	検入日	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		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		3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63557_2020から3塩基欠失検
		TKYE63557a_2020		3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
		TKY3558E6_2020		3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	
F3558	培養検体	TKYE63558a_2020		3/23	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63558_2020から3塩基欠失検
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		3/25	A病院集団感染	武漢型	H5	
		TKYE63736a_2020		3/25	A病院集団感染	武漢型	H5	TKYE63736_2020から3塩基欠失検
		TKYE63738_2020		3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
F3738	培養検体	TKYE63738_2020		3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63738_2020から3塩基欠失検
		TKYE63751_2020		3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	
F3751	培養検体	TKYE63751a_2020		3/25	A病院集団感染	武漢型	H7	TKYE63751_2020から3塩基欠失検
		TKYE64688_2020		3/31		武漢型	H6	
F4688	培養検体	TKYE64688a_2020		3/31		武漢型	H6	TKYE64688_2020から3塩基欠失検
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	C特別養護老人ホーム集団感染	欧州型	H28	
F15178	培養検体	TKYE615178_2020	LC567850	5/5	C特別養護老人ホーム集団感染	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	C特別養護老人ホーム集団感染	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	

Table 4-2 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

Table 4-3 臨床検体と分離培養検体の配列比較

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	A
	21835	T or C	T	T
F10670	21691	C or T	C	C
	25681	A or G	G	G

Table 4-4 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	
ORF1ab	5'UTR	241	C→T	42	S	21600	G→T	2
	313	C→T	37	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	E	26111	C→T	1	
	8782	C→T	2		26301	T→G	1	
	9286	C→T	1	M	26447	C→T	8	
	10376	C→T	1		26730	G→A	2	
	10471	A→G	2		26840	G→A	2	
	11081	G→A	2	ORF7a	26966	T→A	1	
	11083	G→T	2		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						

Table 4-5 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 ($\pi =$)	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*

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Table 5 Patient demographics, comorbidities, disease severity, and results of SARS-CoV-2 qRT-PCR in urine

Patient No.	Age (years)	Sex	Race	Comorbidities	Severity	Days from disease onset to testing of urine	Hospital day	qRT-PCR in urine
1	21	Female	Asian	None	Mild	2	1	UND
2	70	Male	White	Dementia	Mild	2	2	UND
3	53	Male	White	None	Mild	4	1	UND
4	46	Male	Asian	DM	Mild	5	1	UND
5	62	Male	Asian	DL	Mild	6	1	UND
6	41	Male	Asian	None	Mild	7	8	UND
7	54	Male	Asian	None	Mild	11	10	UND
8	29	Male	Asian	None	Mild	13	1	UND
9	29	Female	Asian	None	Mild	28	19	UND
10	43	Male	Asian	None	Moderate	2	1	UND
11	53	Male	Asian	HTN, DL	Moderate	4	1	UND
12	53	Male	Asian	None	Moderate	5	4	UND Ct value: 38.6, VL: 840 copies/mL
13	31	Male	Asian	None	Moderate	8	7	UND
14	28	Male	Asian	None	Moderate	10	1	UND
15	44	Male	Asian	None	Moderate	10	3	UND
16	68	Male	Asian	Post kidney transplant, HTN, OMI	Moderate	11	8	UND
17	83	Male	Asian	HTN	Moderate	16	1	UND
18	63	Male	White	Obesity	Severe	6	1	UND
19	72	Male	Asian	DM, HTN	Severe	7	1	UND Ct value: 38.7, VL: 800 copies/mL
						11	5	UND Ct value: 40.6, VL: 254 copies/mL
20	42	Male	Asian	HTN	Severe	17	11	UND
						9	3	UND

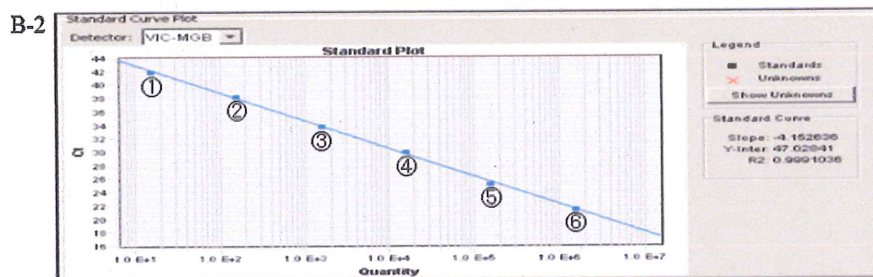
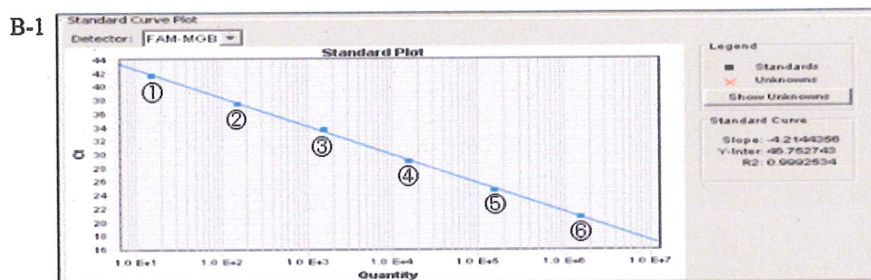
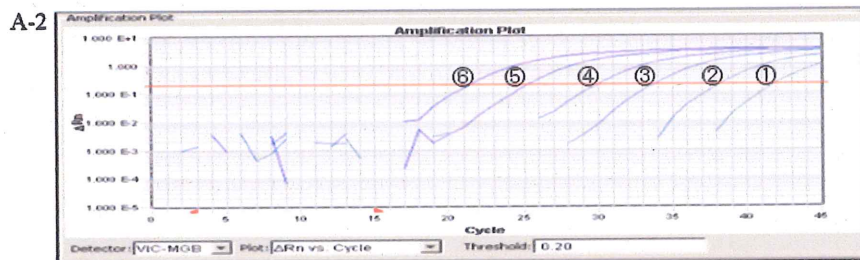
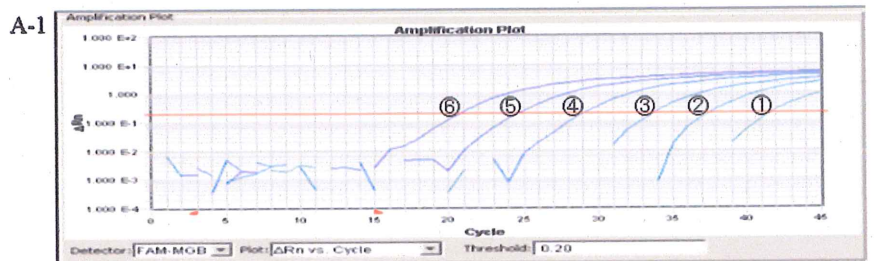


Fig. 1-1 Establishment of the standard curve for HSV quantification by real-time PCR.

- (A) : Amplification plots of HSV-1 (A-1) and HSV-2 (A-2) standards. Genome concentrations are 1.5×10^1 (①), 1.5×10^2 (②), 1.5×10^3 (③), 1.5×10^4 (④), 1.5×10^5 (⑤), 1.5×10^6 (⑥) copies/tube from right to left. For each genome concentration, the normalized fluorescence signal (ΔR_n) is plotted against the PCR cycle number.
- (B) : Standard curve of HSV-1 (B-1) and HSV-2 (B-2) standards generated from Ct values of the amplification plots with ABI Sequence Detection software.

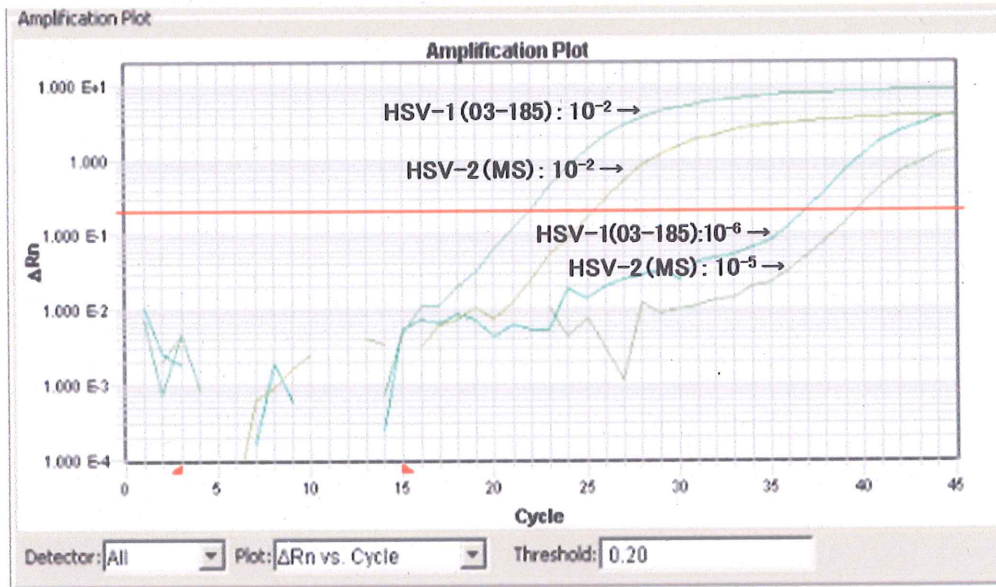


Fig. 1-2 Amplification plots of diluted HSV-1 and HSV-2 DNA using a multiplex real-time PCR assay

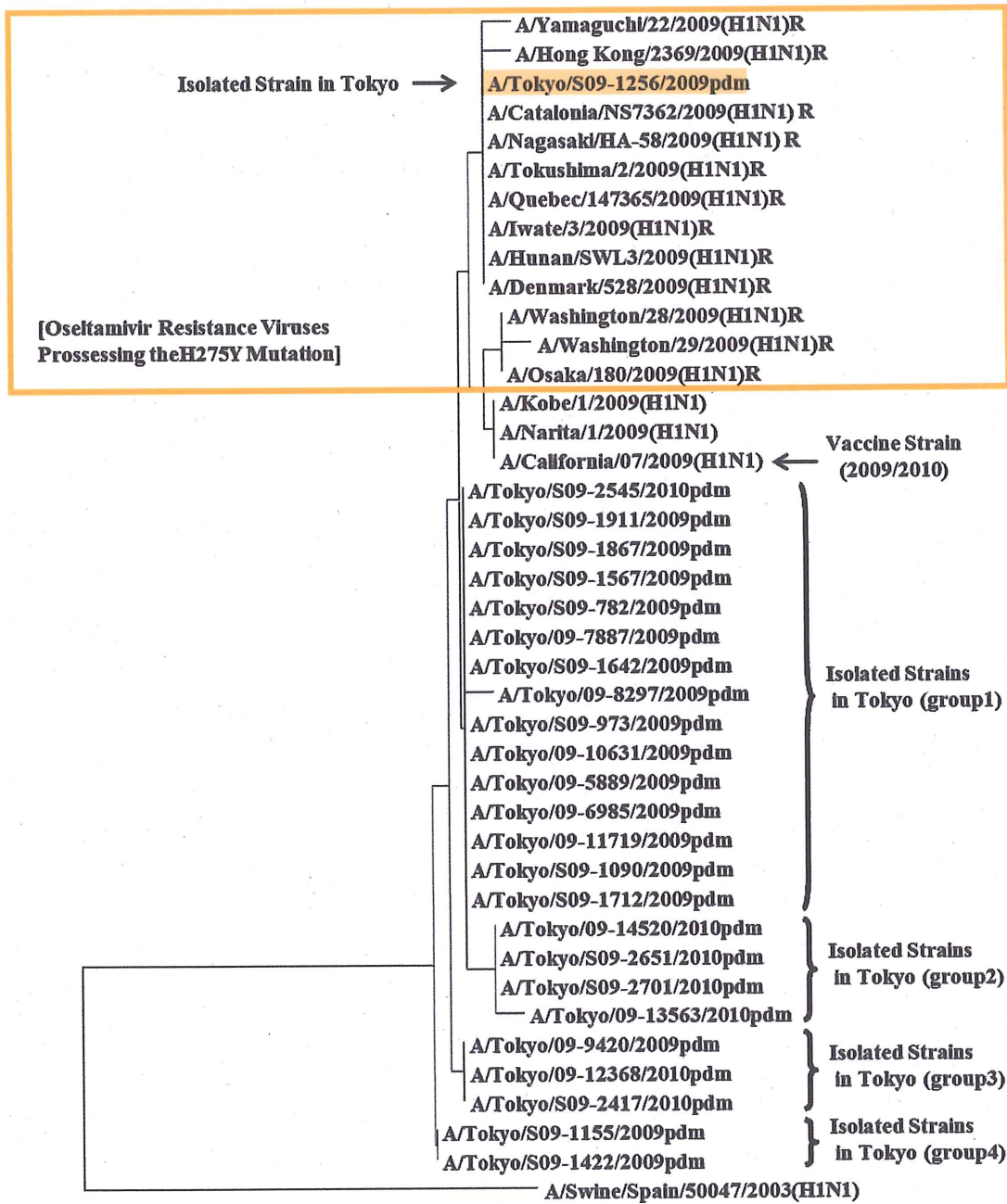
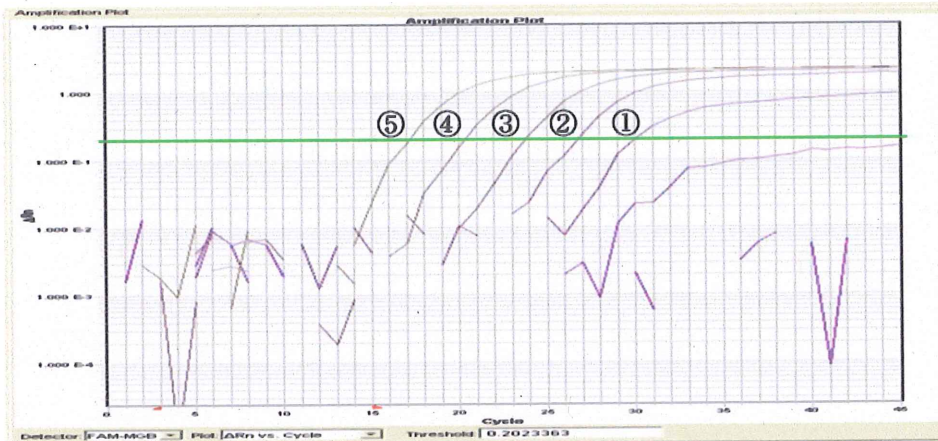


Fig. 2-1 Phylogenetic Tree of NA Gene of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses

(1)



(2)

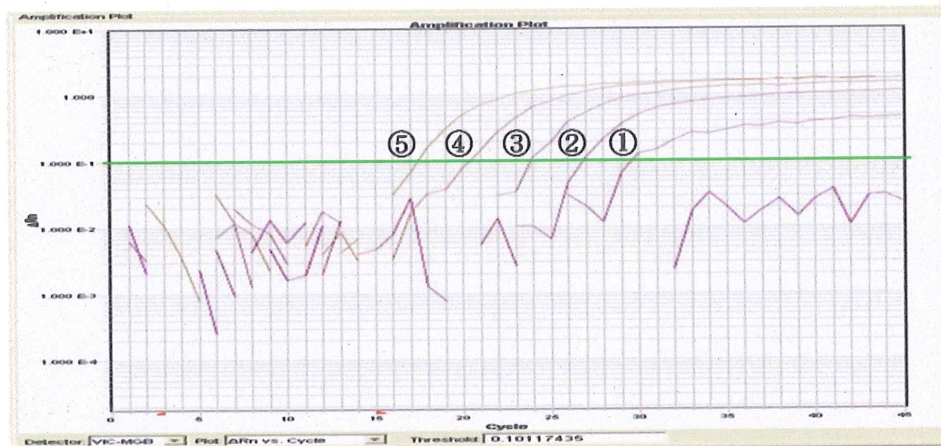


Fig. 2-2 Establishment of the Standard Curve for Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses Quantification by Real-time PCR

Amplification plots of oseltamivir-susceptibility viruses possessing the H275 (1) and oseltamivir-resistance viruses possessing the Y275 (2) standards. Genome concentrations are 9.0×10^2 (①), 9.0×10^3 (②), 9.0×10^4 (③), 9.0×10^5 (④), 9.0×10^6 (⑤) copies/tube from right to left.

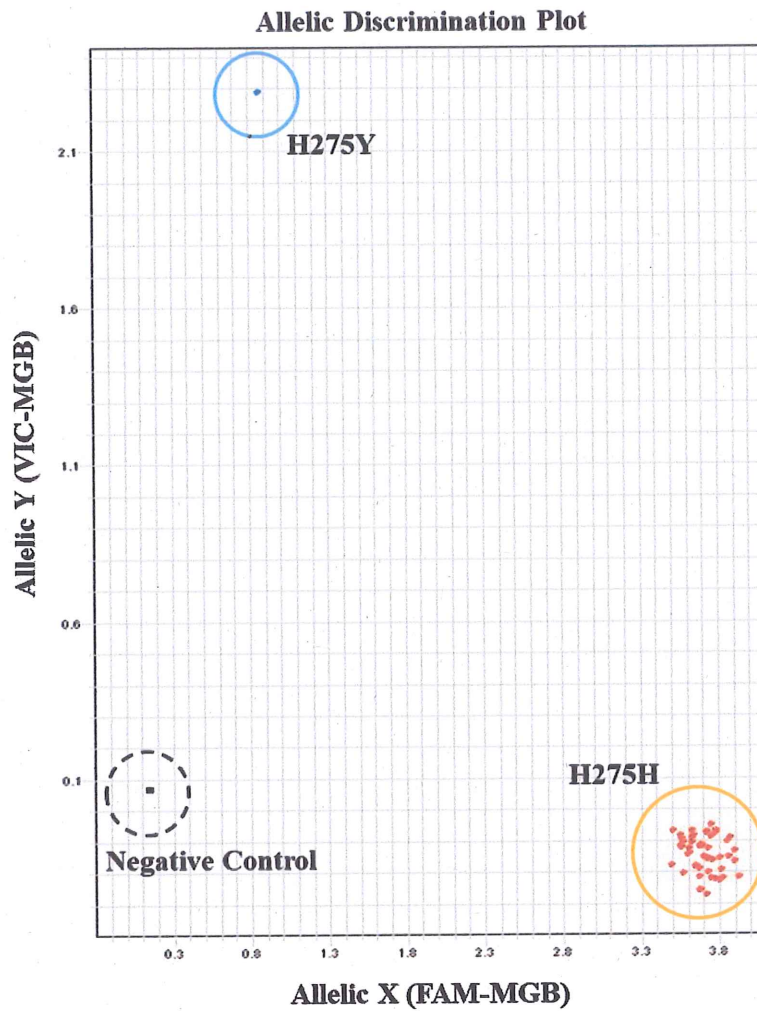


Fig. 2-3 Results of TaqMan Probe PCR-based drug resistance genotyping using Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses

A FAM-MGB-labeled probe was used to detect H275-allels (Allele 1) ; a VIC-MGB-labeled probe was used to detect Y275-alleles (Allele 2)

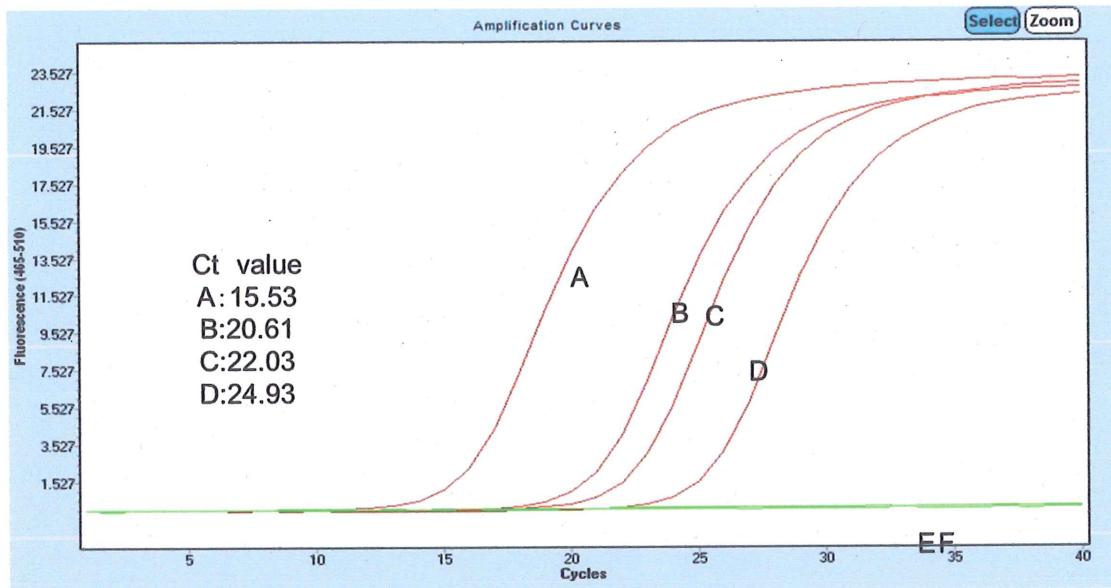
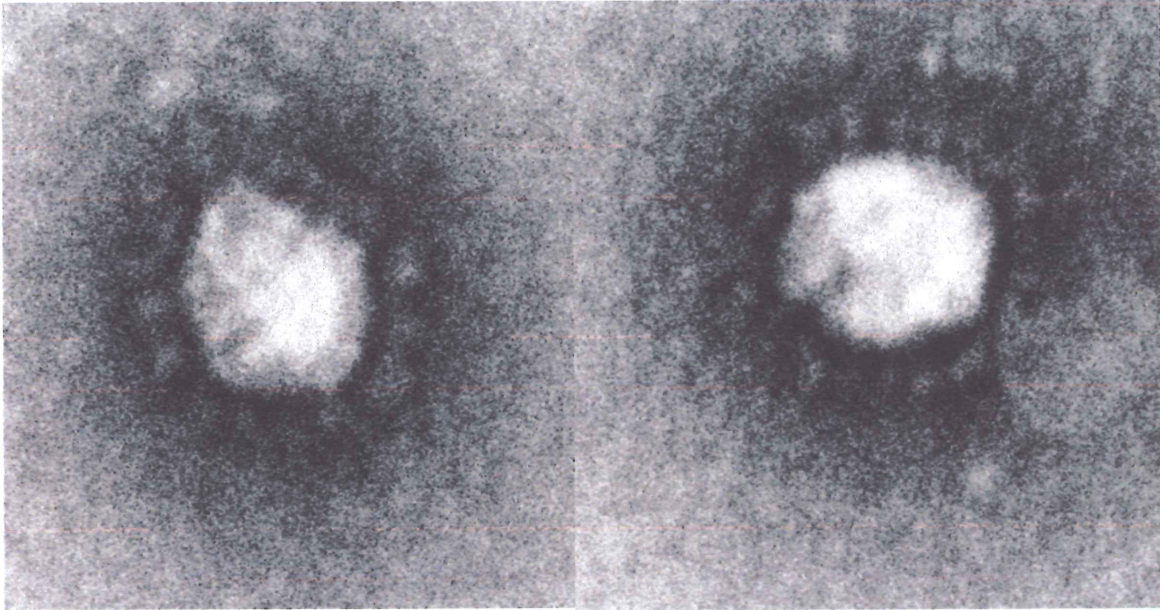


Fig 3-1 SARS-CoV-2 (TKYE6182) levels in cell supernatant by qRT-PCR.

SARS-CoV-2 amplification plots (Cp value) of supernatant in both Vero and Vero E6 cells inoculated with the specimens were measured by qRT-PCR using primer-probe set, open reading frame 1a/b. (A) supernatants at day 4 after inoculation of Vero cells, (B) Vero cell supernatants on day 3, (C) Vero E6 supernatant on day 4, (D) Vero E6 supernatant on day 3, (E) Supernatant from Vero E6 cells alone (no virus) on day 3 and (F) day 4.



**Fig 3-2 Electron microscope image of SARS-CoV-2 (TKYE6182_2020) isolated in Tokyo.
The virion is ~100 nm in diameter with unique envelope structure that are typical for coronaviruses
as indicated**

Databases	Accession ID	Seq No.												359-382 deletion	subtype
		1912	2662	3792	8782	11557	15324	18512	25810	28144	29095	29303	29705		
GenBank	NC045512	C	C	C	C	G	C	C	C	T	C	C	G	-	L
GenBank	LC529905	C	C	C	C	G	T	C	G	T	C	T	G	-	L
GISAID	EPI_ISL_408665	C	T	T	T	G	C	C	C	C	T	C	G	-	S
GISAID	EPI_ISL_408666	C	T	C	T	G	C	C	C	C	T	C	G	-	S
GISAID	EPI_ISL_408667	C	T	C	T	G	C	C	C	C	T	C	T	-	S
GISAID	EPI_ISL_408669	C	C	C	C	T	T	C	G	T	C	T	G	-	L
GISAID	EPI_ISL_407084	T	C	C	C	G	C	T	C	T	C	C	G	Yes	L

Fig 3-3 Comparison of whole genome sequences.

Included in this analysis are the original SARS-CoV-2 (NC045512), our new isolate TKYE6182_2020, and additional 5 isolates from Japan. The sequence of TKYE6182_2020 differs from the original SARS-CoV-2 by only 3 out of 29,903 bases, but differed at 1–8 bases from each of the additional isolates included. There are two subtypes (S and L) in Japan ; TKYE6182_2020 is a subtype L.

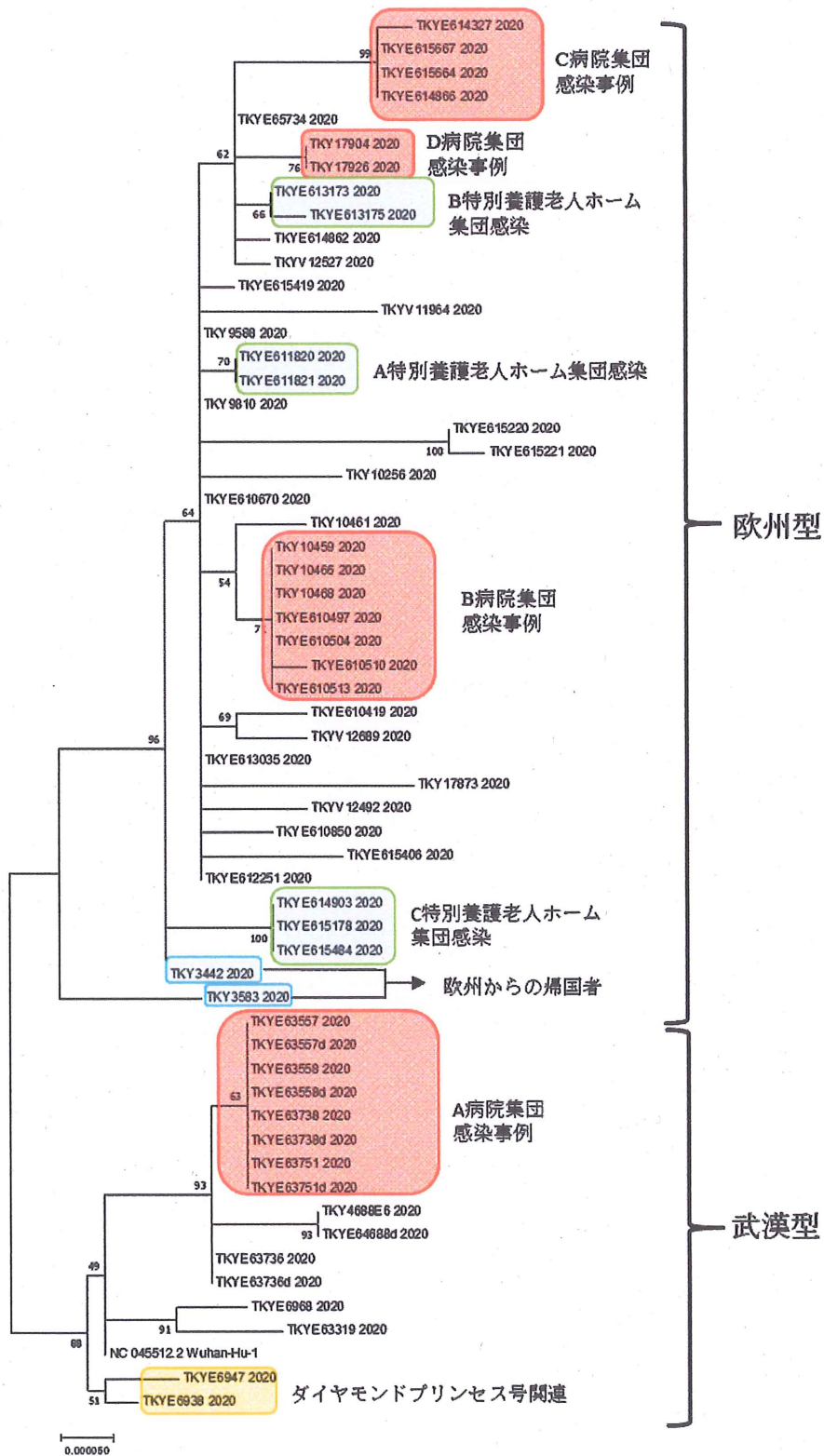


Fig. 4-1 SARS-CoV-2 全長配列の系統樹解析

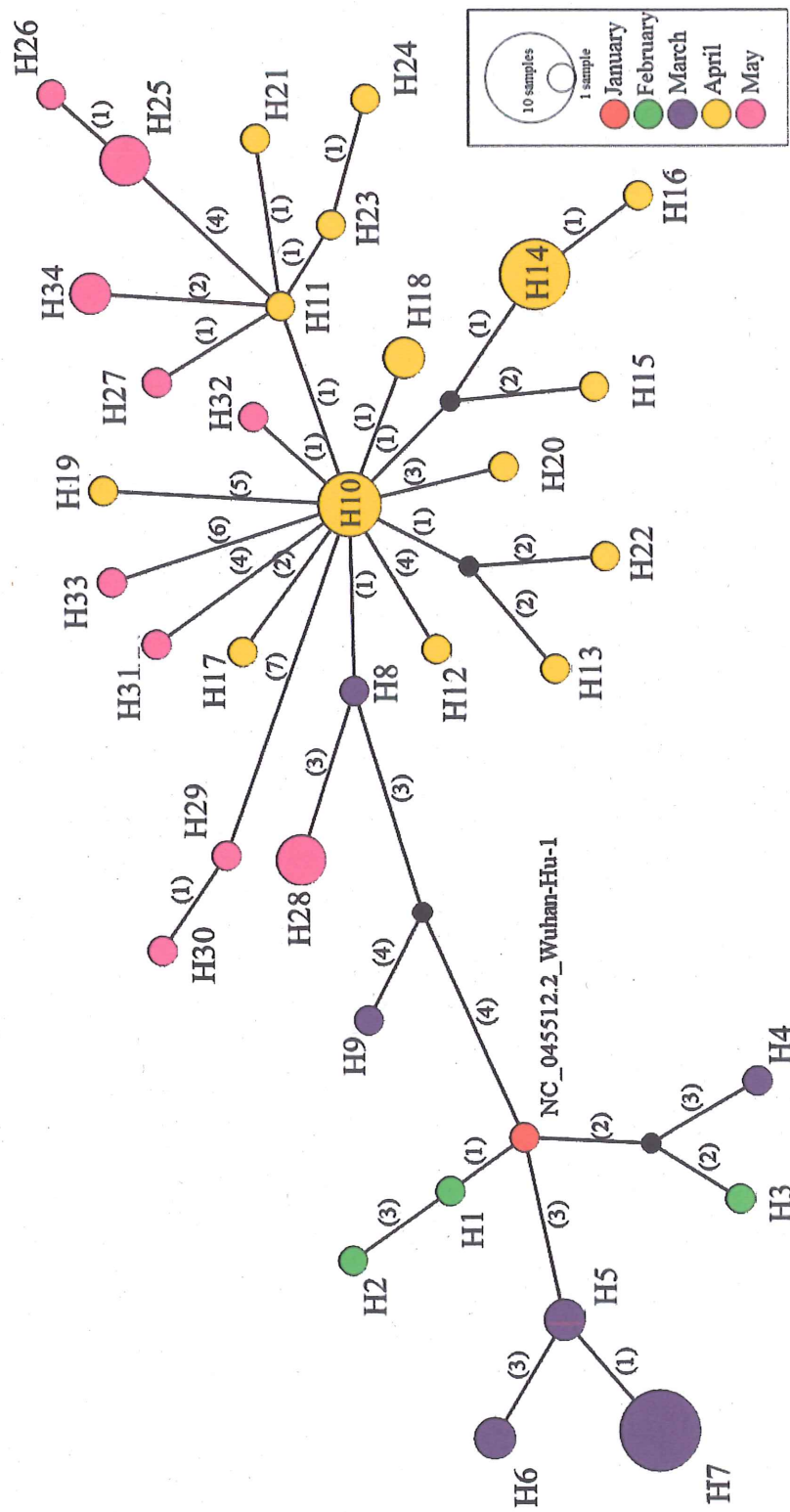


Fig. 4-2 SARS-CoV-2のハプロタイプネットワーク図
 () 内の数字は塩基の相違数を示す。