

# 令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金

## (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 研究

### 「地方衛生研究所における即応体制と相互支援等の確立に対する研究」

#### 分担研究報告書

#### 「大阪における新型コロナウイルスの変異株解析」

研究分担者 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 朝野和典  
研究協力者 同 公衆衛生部 本村和嗣

#### 研究要旨

変異株の早期探知、監視のため、大阪健康安全基盤研究所(大安研)で、次世代シーケンサーを使った全長ゲノム解析系を構築し、積極的疫学調査と併せて包括的に解析して、保健所、行政機関に情報を還元した。変異株を早期探知して、疫学的に特徴を抽出できた集団に対して、早期囲い込みが出来た場合、感染が収束する傾向が見られた。全長ゲノム解析を行い、疫学調査と包括的に解析することで、感染者のリンク、感染経路を推測し、感染制御対策に貢献できた。次世代シーケンサーによる全長ゲノム解析は、新型コロナウイルス感染症対策に、大変、有用であった。

#### A. 研究目的

新型コロナウイルスは、変異によって宿主細胞域の拡大(感染力が増加)、免疫淘汰圧の逃避能を獲得し、変異株が出現し、大流行に至る。2021年は、アルファ株、デルタ株、オミクロン株と、約半年ごとに、新変異株が出現し、世界で大流行をきたした。

本研究では、大阪健康安全基盤研究所(大安研)にて、次世代シーケンサーを使った全長ゲノム解析による新変異株の早期探知、監視を実施し、保健所、行政機関に情報を還元し、囲い込みなどの積極的疫学調査と併せて解析することで、感染症危機対応の強化につなげる事を目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1. 対象と調査期間

大安研にて、行政検査として依頼があった新型コロナウイルス感染症 遺伝子検査で陽性と診断され、ウイルス量が多いと判定されたもの(リアルタイムPCRでCt値が30未満)を対象とする。

##### 2. シーケンス解析

臨床試料より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて、ヒトノロウイルス RNA を抽出し、RNA 検体として用いた。国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターが作成した、「新型コロナウイルス ゲノム解読プロトコル(感染研法)」を参照した。cDNA を鋳型として、98 のプライマーセットで、新型コロナウイルスの全長ゲノムをPCR法で増幅し、Library DNA を作製した。次世代シーケンサー iSeq 100 (illumina 社)、MinION (Oxford Nanopore Technologies 社)を用いて、シーケンス解析を行った。

##### 3. 系統樹解析・多様性解析

配列情報をもとに、MEGA (Molecular Evolutionary Gene Analysis) ver. 7.0 プログラムを用いて、最尤法による系統樹解析を実施した。

#### C. 研究結果

##### 1. 次世代シーケンサーを使った全長ゲノム解析系の構築

コロナウイルスの全長ゲノム解析に特化し、多検体を解析できる感染研法を参照にし、立ち上げに取り組んだ。(a) de novo assembly 法だと1回の稼働で3名分、解析可能であるが、感染研法だと24名分、解析できるため、1検体当たりの解析費用は、de novo assembly 法より、コストダウンが可能となった。(b) de novo assembly 法だと、ウイルス量が高い検体(real-time PCR Ct値 < 27)が解析可能であるが、感染研法だとreal-time PCR Ct値 < 30とウイルス量が減少しても、解析可能となった。

##### 2. デルタ株の動向について

新方法に基づいて、デルタ株の全長ゲノム解析を実施した。HER-SYS 情報からの疫学情報を加え、ゲノム解析、疫学解析と包括的に、発生動向の解析を行った。2021年4-5月にかけて、大阪では、新型コロナウイルス感染症海外渡航関連症例が相次ぎ、2021年5月中旬から6月上旬にかけて、ネパール渡航関連(Group A)によるクラスター発生が、飲食店を中心に相次いだ。しかし、2021年5月中旬から6月上旬にかけて、ネパール渡航関連(Group A)による配列は認められないことから、保健所による早期囲い込みが奏功したことが示唆される。緊急事態宣言が解除された6月下旬以降、他県への移動歴があり、ダンス関連、若年者間で共通する、デルタ株の配列(Group B)が、増えてきていた。7月中旬より、Group B\_1の増加、Group B\_1以外のデルタ株(Group B\_2)の増加が認められてきている。Group B\_1の疫学的共通項は無く、同一のウイルスが、様々な年代層、様々な階層に拡大していることが示唆される。

#### D. 考察

変異株の検出について、全長ゲノム解析によって早期探知し、疫学解析によって疫学的特徴（年齢層、患者背景）を抽出し、保健所や行政機関に情報還元を行った。

保健所の早期囲い込みによる積極的疫学調査が行われると、デルタ株 Group A のように、感染拡大が起きず、収束していくことがわかった。しかし、県境を跨ぐ移動が盛んになり、感染者の行動や追跡調査が困難になると、感染拡大阻止は難しいことが示唆される。

#### E. 結論

次世代シーケンサーによる全長ゲノム解析と疫学調査と包括的に解析を実施し、感染者のリンク、感染経路について、行政機関や保健所に還元することで、感染制御対策に貢献できた。次世代シーケンサーによる全長ゲノム解析は、新型コロナウイルス感染症対策に、大変、有用であった。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Hiroi S, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Morikawa S, Motomura K, Nakayama EE, Okuno Y, Shioda T. Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19, *J Med Virol*, 93:5917-5923. 2021

2. Morikawa S, Otsuka M, Yumisashi T, Motomura K. A longitudinal study on respiratory viral infection for healthy volunteers, *Health Sci Rep*, 4:e413. 2021

3. Tacharoenmuang R, Guntapong R, Upachai S, Singchai P, Fukuda S, Ide T, Hatazawa R, Sutthiwarakom K, Kongjorn S, Onvimala N, Luechakham T, Ruchusatsawast K, Kawamura Y, Sriwanthana B, Motomura K, Tatsumi M, Takeda N, Yoshikawa T, Murata T, Uppapong B, Taniguchi K, Komoto S. Full genome-based characterization of

G4P[6] rotavirus strains from diarrheic patients in Thailand: Evidence for independent porcine-to-human interspecies transmission events, *Virus Genes*, 57:338-357. 2021

4. Kurata T, Kanbayashi D, Komano J, Motomura K. Relationship between biochemical markers and measles viral load in patients with immunologically naive cases and secondary vaccine failure: LDH is one of the potential auxiliary indicators for secondary vaccine failure, *Microbiol Immunol*, 65:265-272. 2021

5. Ikemori R, Aoyama I, Sasaki T, Takabayashi H, Morisada K, Kinoshita M, Ikuta K, Yumisashi T, Motomura K. Two Different Strains of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) in North and South Osaka by Phylogenetic Analysis of Evolutionary Lineage: Evidence for Independent SFTSV Transmission, *Viruses*, 13:177. 2021

6. Kurata T, Yamamoto SP, Nishimura K, Yumisashi T, Motomura K, Kinoshita M. A measles outbreak in Kansai International Airport, Japan, 2016: Analysis of the quantitative difference and infectivity of measles virus between patients who are immunologically naive versus those with secondary vaccine failure, *Journal of Medical Virology*, 93:3446-3454. 2021

##### 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし