

令和2年度「希少感染症診断技術研修会」
2020年12月22日（火曜日）14:45 - 15:15



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

積極的疫学調査？

ゲノム分子疫学解析 ??????

活用するとは？

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

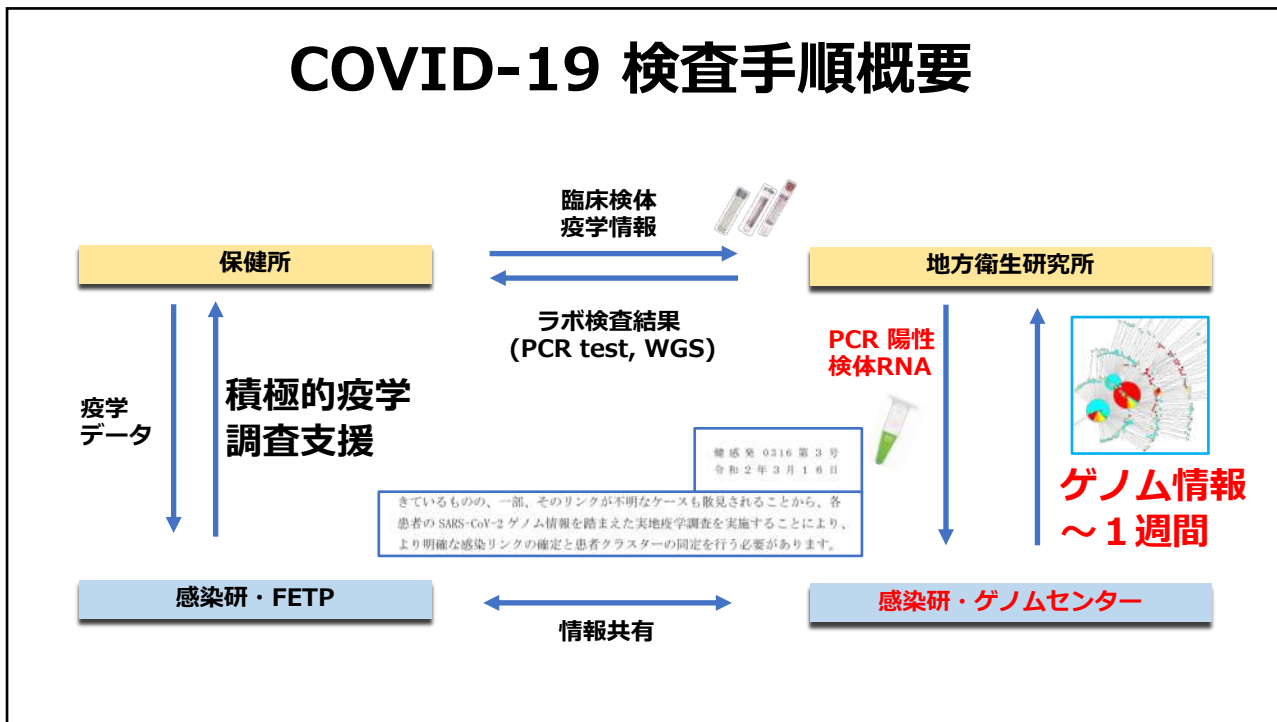
- MLST: 7箇所の代謝遺伝子の塩基配列による分子系統
- Core-genome SNVs (MLST):
ゲノム長の全体共通領域を活用した MLST (cg-MLST と呼ぶ)

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

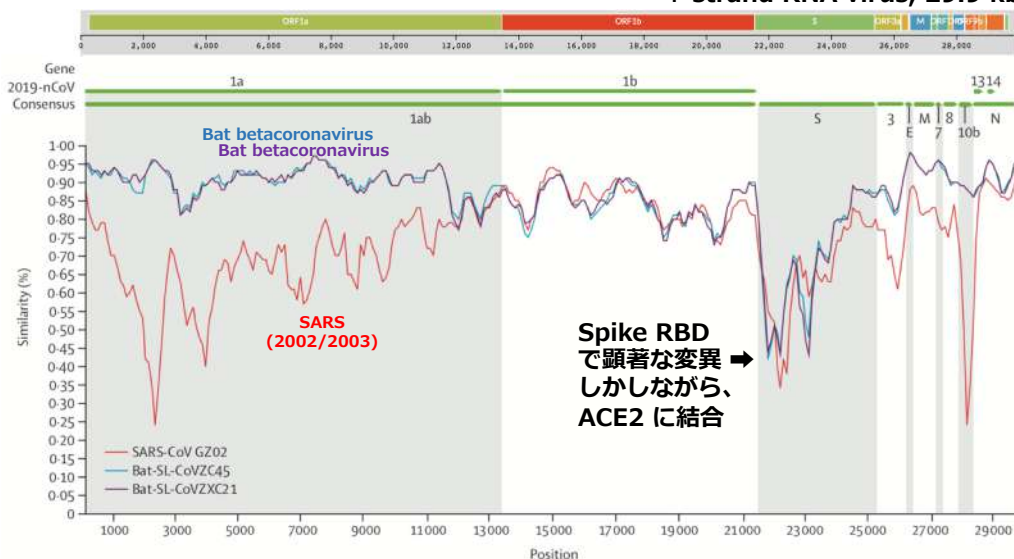
- Pan-genome analysis:
プラスミド、ファージ等の外来配列 (病原性、薬剤耐性等) の有無による分類

COVID-19 検査手順概要



Wuhan-Hu-1 (MN908947, 2019/12/26) SARS-CoV-2 ゲノム構造

+ strand RNA virus, 29.9 kb



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

PLOS ONE PUBLISH ABOUT BR

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>

NIID methods: improved accuracy of WGS

protocols.io

nCoV-2019 sequencing protocol for illumina V.2

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

National Institute of Infectious Diseases, Japan

Apr 08, 2020

Consensus Method Development Community

Steps Abstract Datasets Materials Metadata Metrics

<https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-for-illumina-bnn7zmdhn>

49 multiplex の チューブ2本

Wuhan-Hu-1 (MN908947, 2019/12/26) SARS-CoV-2 ゲノム構造 + strand RNA virus, 29.9 kb

SARS-CoV-2 subgenomic RNA

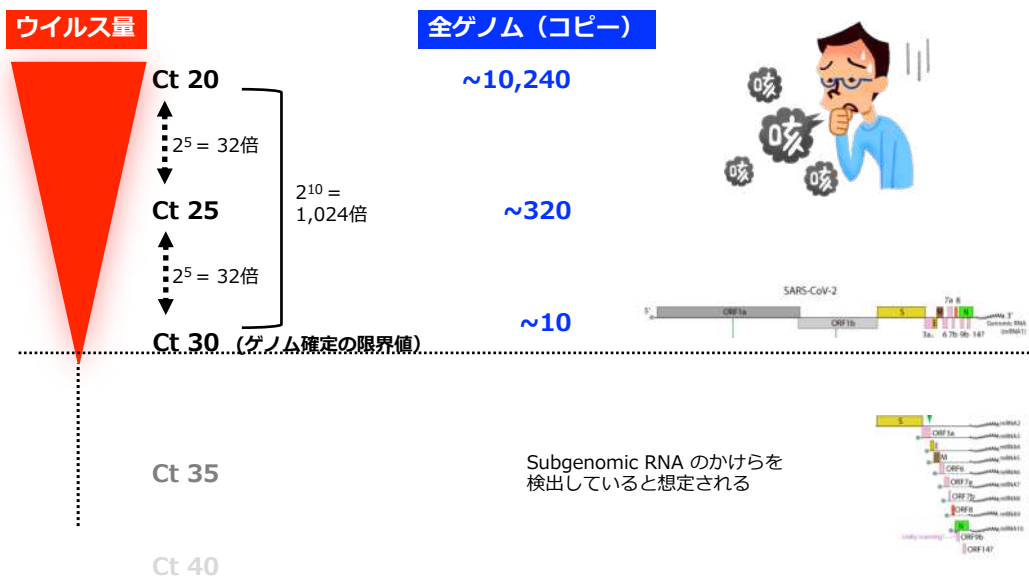
Ct < 30 がゲノム確定の条件

PCR 対象領域

ゲノム全長を確定するためには、全長RNAが最低10コピー必要

つまり、N領域 Ct 35 を示しても、前半の ORF1ab のゲノムRNAが無く、全ゲノム長確定ができない。

ゲノム解読の成否を決める PCR Ct<30 を基準にしている理由



病原体ゲノム解析研究センターのメンバー

自治体

最短 1週間

自治体



検体RNA

検体情報整理・受領

検体ID	検体種別	検体採取日時	検体採取場所	検体採取者	検体採取方法	検体採取量	検体採取状態	検体採取場所	検体採取者	検体採取方法	検体採取量	検体採取状態

黒田誠

ゲノム増幅
ライブラリー作製
NGS解読



糸川健太郎
田中里奈
橋野正紀



ゲノム確定
ネットワーク作製

関塚剛史
谷津弘仁
川野哲郎



感染リンクの報告
黒田誠

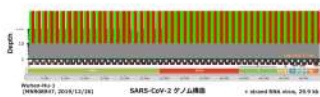
日本医療研究開発機構(AMED)
 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
 「病原体ゲノミクスを基盤とした病原体検査システムの利活用に係る研究」
 代表：黒田誠

次世代シーケンサー技術研修次第

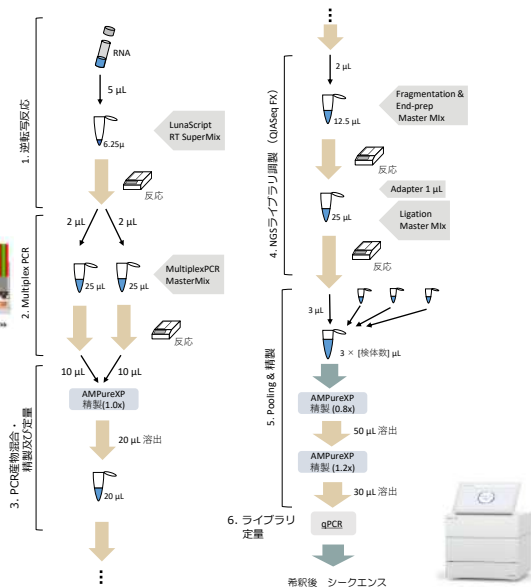
日時： 2020年 10月 27日 (火) 14:00から
 ~
 10月 29日 (木) 14:00まで

会場：国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター実験室
 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

COVID-19 NGS技術研修会 (10/27 - 29, 2020)	
北海道立衛生研究所	感染症部ウイルスG
札幌市衛生研究所	保健科学課微生物係
群馬県衛生環境研究所	研究企画係
茨城県衛生研究所	ウイルス部
埼玉県衛生研究所	ウイルス担当
東京都健康安全研究センター	
千葉県衛生研究所	ウイルス・昆虫医科学研究室
富山県衛生研究所	ウイルス部
神戸市環境保健研究所	感染症部
福岡県保健環境研究所	
熊本県保健環境科学研究所	



プロトコル概観



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

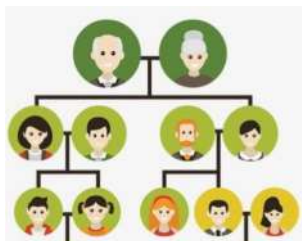
ゲノム情報をどのように利活用すれば、
 感染リンクの推定ができるのか？

Genealogy 系図 (Family tree 家系図)

時間経過

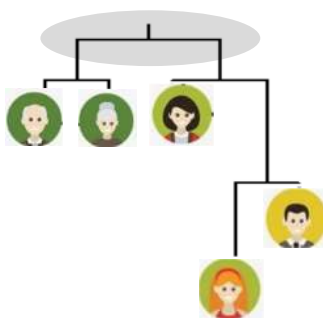


Family tree



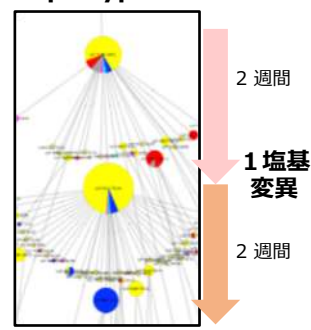
家系図は親子関係が明確

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

Current Status of SARS-CoV-2 mutational data

<http://giorgilab.dyndns.org/coronapp/>

updated September 15, 2020

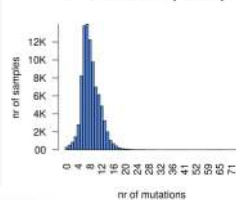
Number of samples: 89978
 Number of distinct mutated loci: 19713
 Total number of mutational events: 743048

Mutation Table for World

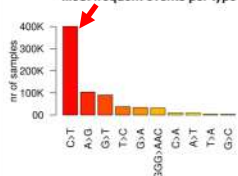
Select Country (or "World"):

World

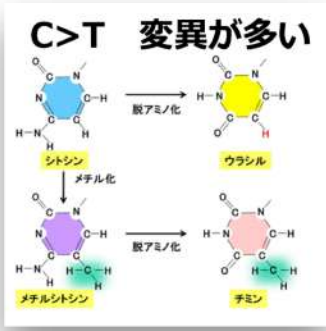
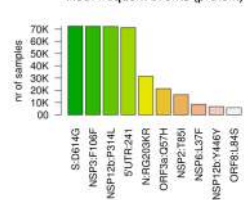
Overall mutations per sample



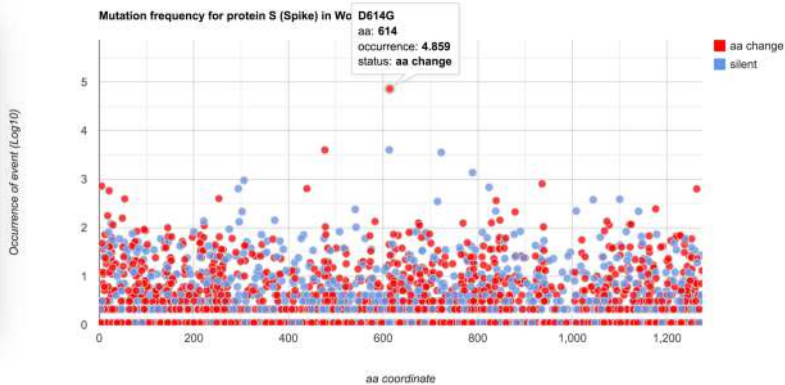
Most frequent events per type

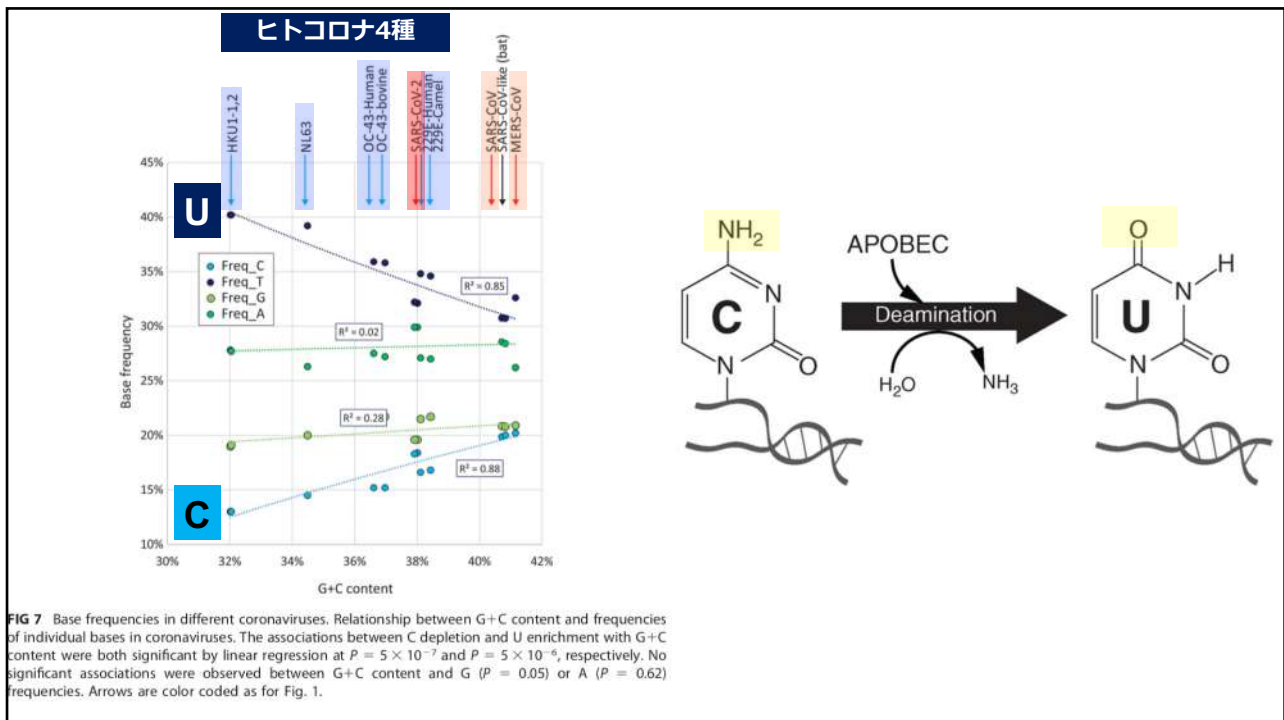


Most frequent events (protein)

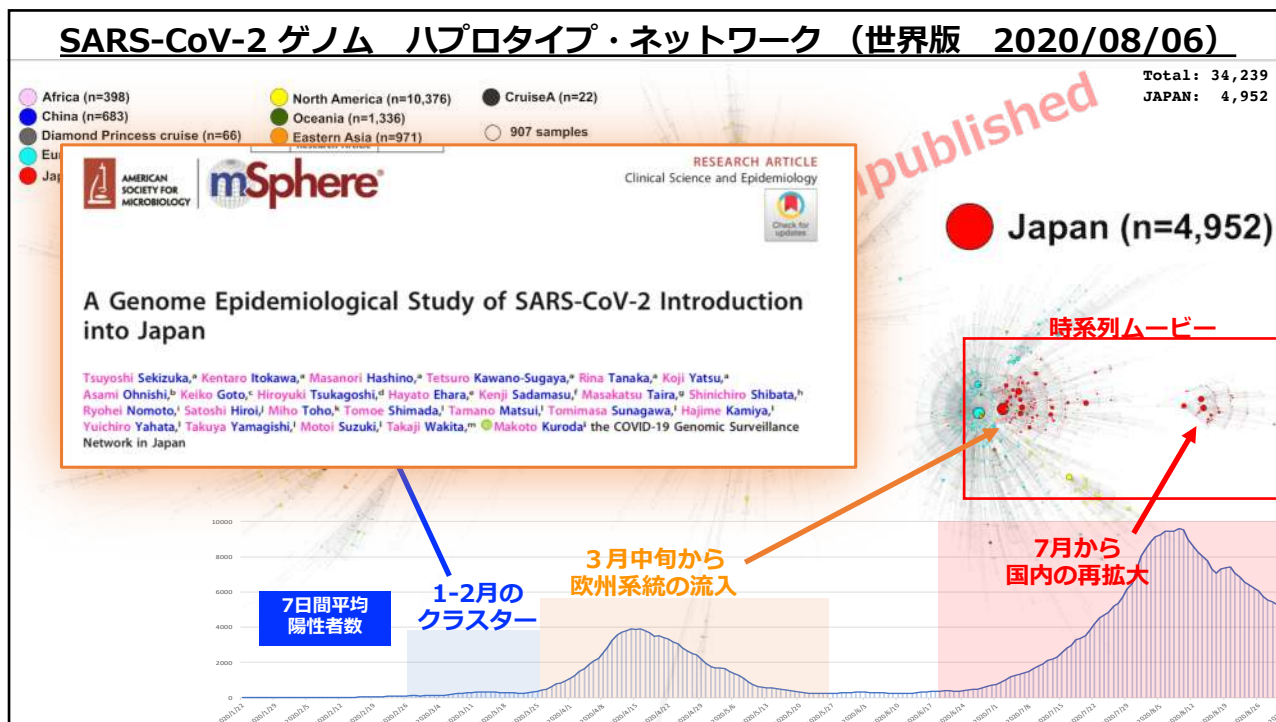


Mutation frequency for protein S (Spike) in Wo





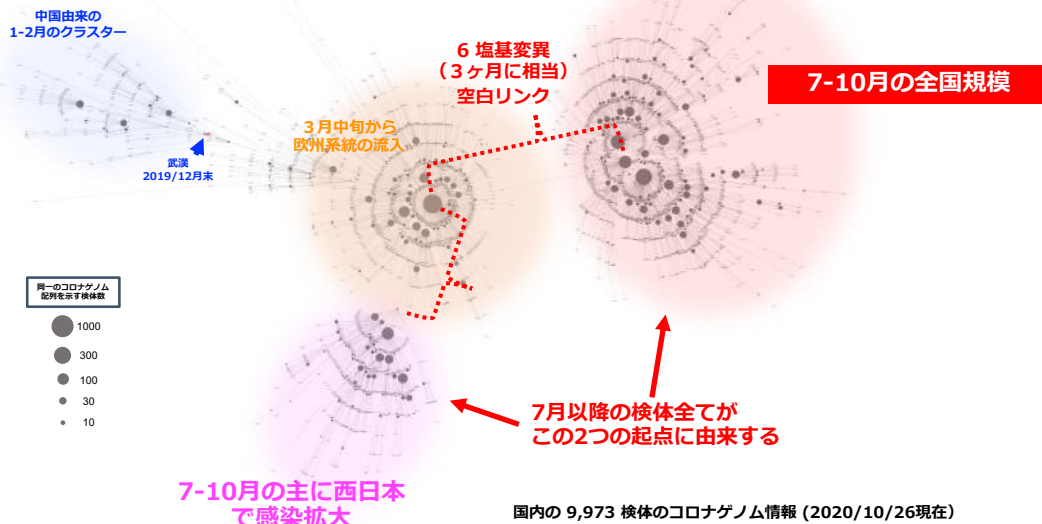
～2020年**8月まで**の JAPAN のゲノム情報を元に



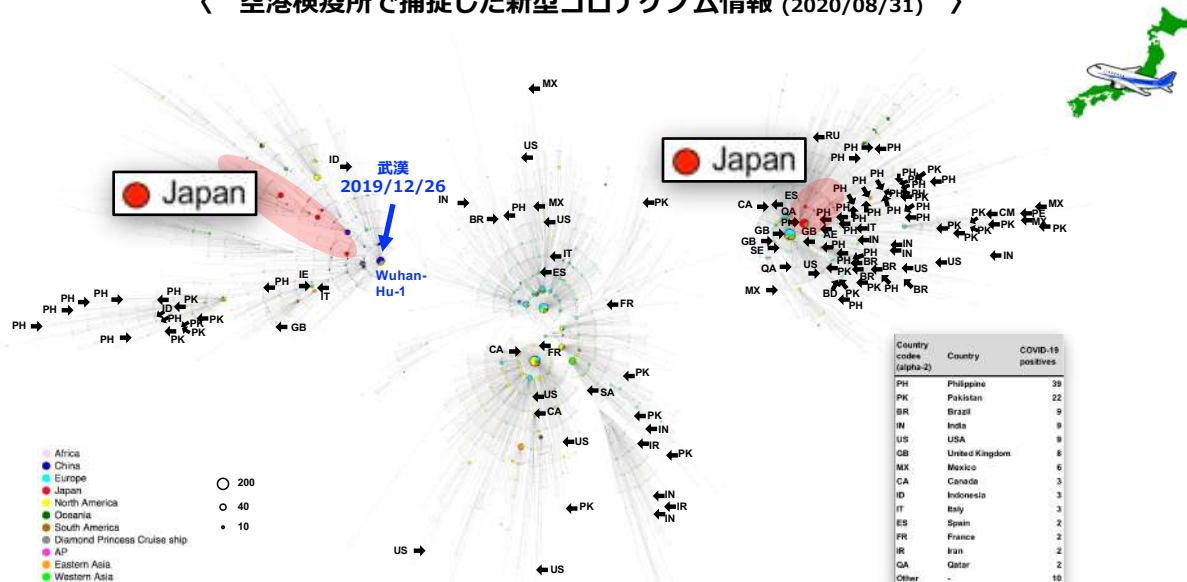
～2020年**10月末まで**の JAPAN のゲノム情報を元に

〈 国内の新型コロナゲノム情報 (2020/10/26) 〉

IASR 速報 2020/12/11



〈 空港検疫所で捕捉した新型コロナゲノム情報 (2020/08/31) 〉



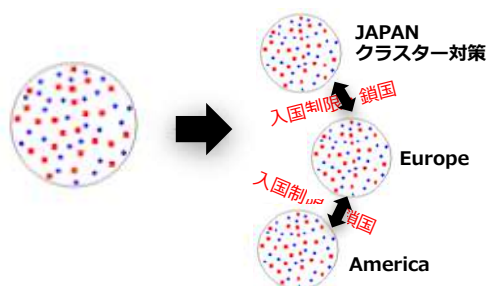
複数の海外流入を受けているが、空港検疫所の水際で阻止できている。

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。

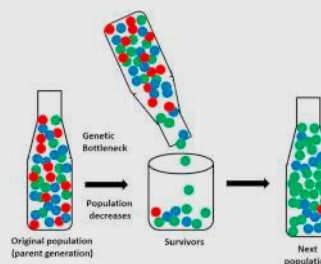
生態学・集団遺伝学の用語。始祖効果（しそこうか）、入植者効果（にゅうしょくしゃこうか）とも呼ぶ。

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

- 都市圏を発端にした全国規模クラスター群に加え、地域特有のクラスター群が新たに顕在化し、**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起点のみ残り他はすべて消滅**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、そして自治体保健所行政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
 千葉県環境保健研究所
 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)
 のご協力を受けました。

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）と厚生労働行政推進調査事業費・「新型コロナウイルス感染症等の感染症サーベイランス体制の抜本的拡充に向けた人材育成と感染症疫学的手法の開発研究」（班長・鈴木基、分担・黒田誠）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	Kentarō 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

