

201318051A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした
感染症対策ネットワーク構築に関する研究
(H25-新興-一般-015)

平成25年度
総括・分担研究報告書

平成26年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

目次

厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

1. 平成25年度総括研究報告書
迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした
感染症対策ネットワーク構築に関する研究・・・・・・・・・・ 1
研究代表者 黒田 誠 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

2. 平成25年度分担研究報告書
 - I. 病原体網羅遺伝子配列を基盤とした分子疫学解析法の開発・・・・・・・・・・ 7
研究分担者 木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター第6室長
研究協力者
塚越博之 吉住正和 小澤邦壽（群馬県衛生環境研究所）
調恒明（山口県環境保健センター）
古川紗耶香（青森県環境保健センター）
水越文徳（栃木県保健環境センター）
平野映子（福井県衛生環境研究センター）
吉富秀亮（福岡県保健環境研究所）
清田直子（熊本県保健環境科学研究所）
仁平稔（沖縄県衛生環境研究所）
石井晴之 倉井大輔 皿谷健 滝澤始（杏林大学医学部第1内科学）
河野陽一 下条直樹（千葉大学医学部小児科）
松田俊二（国立病院機構愛媛医療センター）
岡崎薫（国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター）
菅井和子 宮地裕美子 清水博之（横浜市立大学医学部小児科）
森田幸雄（東京家政大学）
石岡大成 佐藤弘 加納和彦 関塚剛史 竹内史比古 野田雅博
（国立感染症研究所）

 - II. 感染症発生動向調査における迅速かつ網羅解析が必要な検体の収集
および地研間の網羅解析ネットワークの構築・・・・・・・・・・ 15
研究分担者 小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所
研究協力者 丹羽祥一 佐々木佳子 塚越博之 斎藤美香 吉住正和（群
馬県衛生環境研究所）

 - III. 迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策
ネットワーク構築に関する研究・・・・・・・・・・ 18
研究分担者 調 恒明 山口県環境保健センター
研究協力者 戸田昌一、岡本玲子（山口県環境保健センター）、村田祥子（山
口県環境保健センター）、富田正章（山口県環境保健センター）、高橋徹（山
口県立総合医療センター）、内田正志（徳山中央病院）、門屋亮（山口赤十
字病院）、鈴木英太郎（鈴木小児科）、河野祥二（下関市民病院）、佐藤穰（国
立病院機構関門医療センター）

IV.	迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策 ネットワーク構築に関する研究	24
	研究分担者 佐多徹太郎 富山県衛生研究所 研究協力者 小淵正次、滝澤剛則、名古屋真弓、板持雅恵、稲崎倫子、嶋 一世、綿引正則、磯部順子、木全恵子、清水美和子、増田千恵子、金谷潤 一（富山県衛生研究所）	
V.	迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策 ネットワーク構築に関する研究	33
	研究分担者 齋藤幸一 岩手県環境保健研究センター 研究協力者 木村博一（国立感染症研究所）、高橋雅輝、佐藤直人（岩手 県環境保健研究センター）	
VI.	迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策 ネットワーク構築に関する研究	37
	研究分担者 舘田一博 東邦大学医学部微生物・感染症学講座 研究協力者 青木弘太郎、嵯峨 知生、石井 良和（東邦大学医学部微生物・ 感染症学講座）	
VII.	不明症例の病理検体からの新規病原体検索	41
	研究分担者 片野晴隆 国立感染症研究所・感染病理部 研究協力者 福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、保科しほ、中島典子、長谷川 秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）、都築慎也、佐藤典子、望月眞、峰 宗太郎、松下竹次（国立国際医療研究センター）、黒田 誠、関塚剛史（国 立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）、李 天成（国立感染症 研究所・ウイルス第2部）、鈴木哲朗（浜松医科大学）、梁 明秀（横浜市 大医学部）	
VIII.	病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による 抗原解析と新規病原体検査法の開発	48
	研究分担者 梁明秀 横浜市立大学医学部微生物学 研究協力者 松永智子（横浜市立大学医学部微生物学）	
3.	研究発表一覧	51

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究代表者 黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）
研究協力者 関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）
竹内史比古（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・室長）
山下明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

未知病原体や変異病原体による感染症疑いの不明症例の解明や、新興感染症の汎発流行に対する確な対処法を立案・整備する上で、次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA sequencer: NGS）による網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つと考えている。本計画は、臨床検体から網羅的に病原体を検出する次世代型病原体検査法へと発展させ、原因不明症例を不明のまま残さない抜本的な検査法の改革に貢献するのが目的である。現在、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで行政検査・依頼検査を遂行中であるが、これら技術を普及させるべく、迅速な現場対応を可能とする地研・大学病院との感染症対策ネットワークの構築を目指す研究班である。

本年度は研究代表者として大学病院・地研でも次世代型検査法が運用可能になるよう、感染研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サーバー MePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) の運用も開始し、次世代シーケンサーを有する研究分担者（地研・大学病院）が活用できるようシステム整備した。次世代シーケンサーを導入した群馬衛研、山口衛研、富山衛研、東邦大をはじめ、計9機関の検査担当者に技術研修を行い技術力向上に貢献した。各分担機関で懸案になっていた不明症例を中心に、本技術研修を通して網羅配列解読した結果、簡易微生物検査キットでは陰性だったロタウイルス症例を特定することに成功し、既存キットの“特異性”だけでなく“感度”においても問題点を指摘することができた。現在汎用されている検査キットのみでは不十分であり、これら成果を検査現場に還元することで従来の病原体検査体制（レファレンス活動）へも十分に貢献することが可能だと確信した。

不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。逐次、ネットワークの効率が悪い律速段階をチェックし、臨機応変かつ重点的にエフォートを投じ、従来のレファレンス活動をより重厚なシステムへと補強していきたい。今後さらに重厚な感染研と連携ネットワークを構築し、迅速に病原体検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

研究分担者：

木村博一	国立感染症研究所・感染症疫学センター
小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
調 恒明	山口県環境保健センター
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
齋藤幸一	岩手県環境保健研究センター
館田一博	東邦大学・医学部・微生物・感染症学
片野晴隆	国立感染症研究所・感染病理部
梁明秀	横浜市立大学・医学部・微生物学

A. 研究目的

感染症疑いのある不明症例・バイオテロ・新興再興感染症などアウトブレイク対策のための迅速・網羅病原体解析法を基盤とした感染症対策ネットワークシステムの構築を行う。次世代シーケンサー（流れ図参照）は大量の核酸配列を偏見無く網羅的に解

読することができ、本計画には必要不可欠である。解読の結果、従来法で特定できない易変異性 RNA ウイルスも“塩基配列”として確定することができる。地方衛生研究所（地研）における感染症発生动向調査においても、重症あるいは原因不明感染症由来の病原体網羅解析のニーズは極めて高く、1次ス

クリーニングとして臨床検体からダイレクトに解読検査し、患者に生じている実像を把握することは早期解決への極めて有効な手段と考えられる。

感染研では、次世代シーケンサーの解析パイプラインを整備し、不明症例について病原体候補の特定に役立ててきた（養殖ヒラメ・O111・新規サポウイルスによる集団食中毒、ワクチン接種後の脳炎）。しかしながら、網羅配列解読法は認知されつつあるが先端的すぎるために、結果の解釈と情報処理に困難を伴う場合も少なくない。また、地研との物理的な距離、諸手続き等による遅延が生じ、有効な解析法であっても迅速性を発揮できない。

病原体の網羅的 PCR 検査法は開発されているが、未知・易変異性ウイルス等では同定不能になる事例が少なくない。それを補うための次世代シーケンサーによる“迅速性”と“包括性”を地研および基幹病院などの検査・医療現場に提供することを重視し、3 年計画で地方衛生研究所と基幹病院と感染研との相互連携ネットワークの整備を重点的に行う。不明症例を迅速に究明するセーフティネットとして、わが国における包括的な感染症対策に貢献することを目指す。

B. 研究方法

1. 感染症発生動向調査および食中毒事例において、迅速かつ網羅解析が必要な検体の収集および地研間の網羅解析ネットワークの構築

通常業務内で依頼された集団および重症例の臨床検体（髄液、血清、咽頭拭い液、便、尿）を次世代シーケンサーにより網羅配列解読を行う（研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田）。感染研では、各地研からの要望に応じて不明・重症例について適宜、網羅配列解読（研究代表者：黒田）および病理検体から新規、既知病原体の検索を行う（研究分担者：片野）

得られた配列をネットワーク経由で感染研（代表者：黒田）に転送し、担当者相互で病原体検索にあたる。従来の鑑別診断結果と網羅配列解読法の結果が符合するのかわかり、一般検査法と網羅配列解読法の特異性・感度について検討する（研究代表者：黒田、研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田）

2. 不明感染症疑いの中でも厚労行政上で最重要項目である重症例を最優先し、想定以上の増悪に関わる混合感染など病原因子の特定も検討する。（研究代表者：黒田、研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田・片野）

（倫理面への配慮）

試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられる。本研究で対象となる患者から検体を採取する場合は、各医療機関の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。緊急の対応が必要であったり、各医療機関の倫理委員会で検討できない場合は、感染研の倫理委員会で包括的に審査されるものとする。

連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々の ID とし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこの ID を運用して行う。申請者には ID が付けられた検体と添付の情報が送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する（連結可能匿名化）。したがって、申請者において個人を特定することはできないようにする。本計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認を受けた（H25/7/30 No.417, H26/2/18 No.495）。

C. 研究結果

1) ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体を送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速な病原体鑑別に資するものと考えている（図 1）。

本システムで特に重要なのが配列解読後の情報解析にあたる。基本、情報解析に特化した専門家が必要となるが、各自治体に人材を用意もしくは養成している余裕はない。そこで、その煩雑な解析部分ができるだけ簡便化するために、検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用できるよう、Web interface による情報解析パイプラインを用意した。

2) 配列解読から情報解析まで

ベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) の解読リードを病院・地方衛生研究所等でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) を構築した（図 2）。情報解析を習熟してい

ない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるような利便性を考えて作成した。本システム MePIC は、感染研、地方衛生研究所においても利用可能な次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする Web 情報解析サービスであり、現在、アカデミアのみアカウント取得可能として提供している。

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

3) Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC

MiSeq 等の次世代シーケンサーの解読リードを下記の手順で必要な情報パラメーターを設定し、解析ボタンのワンクリックで解析をシームレスに行うことができる (図 3)。

- ① Target read files:
次世代シーケンサーの解読リードをアップロード
- ② Reads trimming:
解読リードの不必要なアダプター配列の削除とクオリティーの低い塩基の削除
- ③ Screening:
bwa mapping 法によるヒト配列の削除 (マウス等、他のほ乳動物のゲノム配列など、別途、レファレンス配列の指定が可能)
- ④ Reads classification:
megaBLAST によるデータベース検索。各種データベースの選択が可能。非特異的なヒットを選択しないよう、E-value 等の閾値の変更も可能

MePIC で解析した Megablast 解析結果は、配列アライメントを含むテキスト配列で排出される。そのテキスト配列をフリーソフト MEGAN (MEtaGenome Analyzer <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>) で生物種毎の系統分類をおこない、病原体候補を探索していく。臨床検体に内在する数多くの候補生物が抽出されるため、ここでの探索には病原体と感染症の知識が多分に要求される。

4) 網羅的病原体検査法の技術研修

臨床検体の DNA/RNA 調整、ライブラリー作製、MiSeq 次世代シーケンサー解読、情報解析までの技術研修を執り行った (4 日間)。下記研修受講者を 4 回に分けて実施した。

- ・技術研修を修了した地衛研 9 拠点：
青森県環境保健センター
群馬県衛生環境研究所
富山県衛生研究所

東邦大学・医学部
岩手県環境保健研究センター
栃木県保健環境センター
山口県環境保健センター
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所

得られた成果については各分担者の研究報告書を参照。

D/E. 考察・結論

現在、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで感染症疑いの不明症例に対して行政検査・依頼検査を遂行中であるが、網羅的病原体検索法を普及させるべく、迅速な現場対応を可能とする地研・大学病院との感染症対策ネットワークの構築を目指している。本年度は感染研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サーバー MePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) の運用を開始し、次世代シーケンサーを有する研究分担者 (地研・大学病院) が活用できるようシステム整備できた。実際に本検査法が現場で活用できるよう、計 9 機関の検査担当者に技術研修を行い、各検査機関で懸案になっていた不明症例への解明に有効かどうか検討することができた。特に、簡易微生物検査キットでは陰性だったロタウイルス症例を特定することに成功し、既存キットの“特異性”と“感度”の問題点を発見し、従来の病原体検査体制 (レファレンス活動) へ還元できるシステムだと確信した。

不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。今後さらに重厚な感染研と連携ネットワークを構築し、迅速に病原体検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

F. 健康危険情報 とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67 (1): 62-65.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

網羅シーケンスの環境は整った。

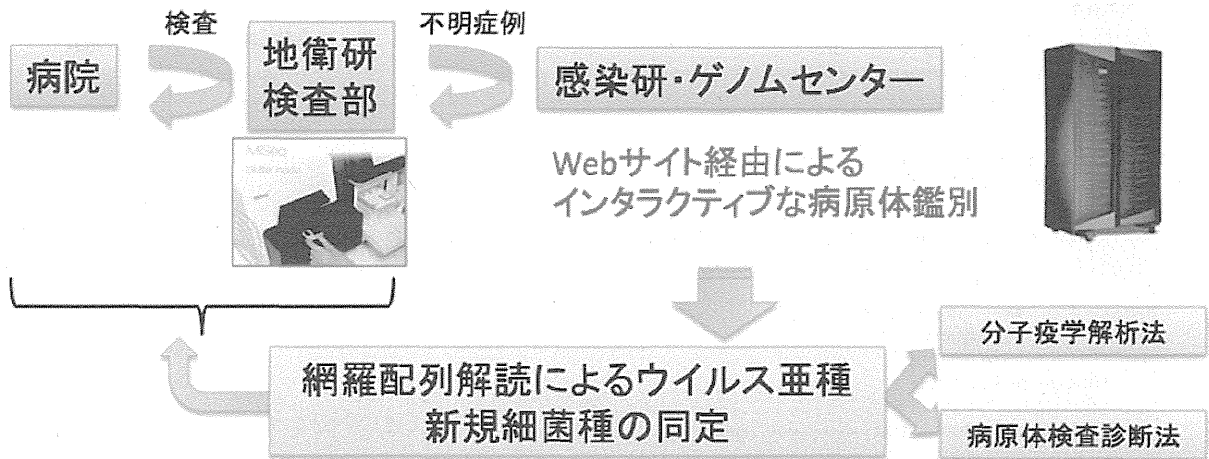



図1 ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検出のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

次世代型病原体検索システムをサポートする

Web情報解析サービスの提供

MePIC, Metagenomic pathogen identification for clinical specimens

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>



Welcome to MePIC v2.0

Please login to start

User ID: Password:

First visit? Please [register account](#).

[to MePIC manual](#)

- ヒト臨床検体からの網羅配列解読 (メタゲノム解読) の情報解析
- 臨床検体に内在する微生物群の分類
- 初心者でも使いやすい (生物学、感染症学の知識は欲しい)

現在、アカデミアのみアカウント取得可能

MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, Ogasawara Y, Mizuta K, Kuroda M. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):62-5. PMID: 24451106

図2 臨床検体から直接に網羅配列解読したリード配列の情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC)。次世代シーケンサー NGS による解読リードの Web 情報解析サービス。

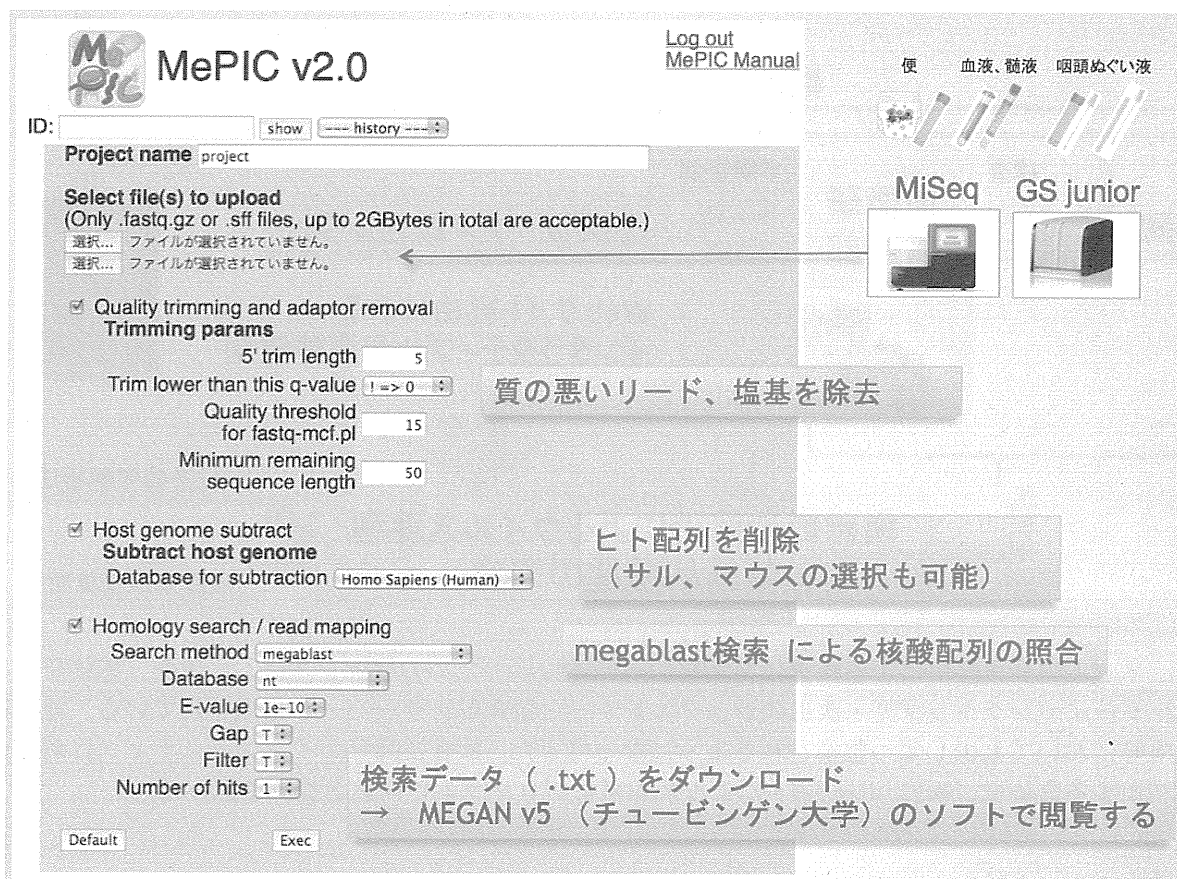


図3 MePIC の操作画面の仕様。NGS リードから i) 質の悪いリード、塩基の除去、ii) 臨床検体に内在するヒト配列の削除、iii) megablast 検索による病原体検索。この i - iii までの一連の流れを一度に完結させるパイプライン。

➤ 次世代シーケンサー の配備状況:

研究分担者機関に次世代シーケンサーMiSeq が配備された。

- ❑ 群馬県衛生環境研究所
- ❑ 富山県衛生研究所
- ❑ 山口県環境保健センター
- ❑ 東邦大学・医学部

➤ 次世代シーケンサー技術研修

ライブラリー作製から解読、情報解析まで。3-4日間。計4回実施

・技術研修を修了した地衛研9拠点:

- ◇ 青森県環境保健センター
- ◇ 群馬県衛生環境研究所
- ◇ 富山県衛生研究所
- ◇ 東邦大学・医学部
- ◇ 岩手県環境保健研究センター
- ◇ 栃木県保健環境センター
- ◇ 山口県環境保健センター
- ◇ 愛媛県立衛生環境研究所
- ◇ 沖縄県衛生環境研究所

➤ 次世代シーケンサー の情報解析の運用状況:

網羅的病原体検査法の情報解析パイプライン MePIC v2 を公開・運用中。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を
基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究代表者 黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター長

病原体網羅遺伝子配列を基盤とした分子疫学解析法の開発

研究分担者 木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター第6室長
研究協力者

塚越博之 吉住正和 小澤邦壽（群馬県衛生環境研究所）

調恒明（山口県環境保健センター）

古川紗耶香（青森県環境保健センター）

水越文徳（栃木県保健環境センター）

平野映子（福井県衛生環境研究センター）

吉富秀亮（福岡県保健環境研究所）

清田直子（熊本県保健環境科学研究所）

仁平稔（沖縄県衛生環境研究所）

石井晴之 倉井大輔 皿谷健 滝澤始（杏林大学医学部第1内科学）

河野陽一 下条直樹（千葉大学医学部小児科）

松田俊二（国立病院機構愛媛医療センター）

岡崎薫（国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター）

菅井和子 宮地裕美子 清水博之（横浜市立大学医学部小児科）

森田幸雄（東京家政大学）

石岡大成 佐藤弘 加納和彦 関塚剛史 竹内史比古 野田雅博
（国立感染症研究所）

研究要旨

Bayesian Markov chain Monte Carlo(MCMC)法を用い、本邦で急性呼吸器ウイルス感染症から検出されたヒトライノウイルス(HRV)VP4/VP2領域およびRSウイルス(RSV)G遺伝子の時系列系統解析を行った。さらに、解析遺伝子部位の相同性解析、株間の遺伝学的な距離(*p*-distance)解析、positive selection解析および塩基置換速度解析を行った。その結果、HRV-A および HRV-C の起源は約 20,000 年前、RSV は、約 150 年前にさかのぼることが推定された。HRV-C 株間の *p*-distance は長く、多数の遺伝子型に分類されることがわかった。一方、RSV の *p*-distance は比較的短く、少数の遺伝子型のウイルスが本邦の呼吸器ウイルス感染症に関与していたことが示唆された。

A.研究目的

RSウイルス(RSV)およびヒトライノウイルス(HRV)は呼吸器感染症の主要なウイルスとして認識されている^{1,2}。特に、RSVは乳幼児に気管支炎、細気管支炎や肺炎を引き

起こし、HRVは気管支喘息の発症・増悪に関与することが示唆されている。しかし、これらのウイルスの詳細な疫学は未だに不明な点が多い。いうまでもなく、ウイルス感染症の原因究明に、患者情報に原因ウイルスの

遺伝学的解析データなどを加味した分子疫学解析は必要不可欠である。今まで、分子疫学解析の基盤である系統解析は、主に近隣結合法(NJ法)などにより行われてきたが、本方法はクラスター解析アルゴリズムに解析の礎をおくため、時系列に関するパラメーター得ることができない。その一方、近年、新しい数理統計解析学的手法による時系列系統解析、Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC)法が開発され、より詳細なウイルス感染症の分子疫学が解明されつつある³。本研究においては、RSVの主要抗原をコードしているG遺伝子(C-terminal 3rd hypervariable region)およびHRV-AおよびCのVP4/VP2領域を主体としたMCMC法による時系列系統解析、相同性解析、株間の遺伝学的な距離(*p*-distance)解析、positive selection解析および塩基置換速度解析を行った結果を以下に報告する。

B. 研究方法

HRVは、0-91歳(3.0±3.0歳)の急性呼吸器感染症(ARI)由来の咽頭拭い液(904検体)、気管吸引液(1検体)および喀痰(1検体)を材料とした。常法により、VP4/VP2領域遺伝子(position: 623-1012; 390 bp)をRT-PCRによって増幅し、ダイレクトシーケンス法により、塩基配列データを得た⁴。

RSVは、2008年10月から2011年9月までに栃木県内で採取された16歳以下のARI由来の咽頭拭い液(739検体)を材料とした。常法により、G遺伝子(position: 673-912; 240 bp strain AUS/A2/61, position: 670-963; 294 bp strain BA/4128/99)をRT-PCRにより増幅・シーケンス解析を行った⁵。

それぞれ得られた塩基配列はCLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)により多重整列化し、Kakusan 4 program version 4.0 (<http://www.fif-thdimension.jp/products/kakusan/>) (Tanabe, 2011)により塩基置換モデルを選択しBayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC)法による解析をBEAST

package version 1.7.4 (Drummond and Rambaut, 2007)を使用して行った⁶。さらに、MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>)を使用してpairwise-distance(*p*-distance)を計算した⁷。

C. 結果

HRVは、906検体中96検体(10.6%)から検出された。HRVが検出された患者の平均年齢は、1.0±1.5歳(平均値±標準偏差)であり、主に上気道炎の患者より検出された。検出されたHRVは、さらにHRV-A(58株)、HRV-B(4株)、HRV-C(34株)に分類された(図1)。系統樹解析の結果から、HRVは21,364年前に分岐していることが分かり、分子進化速度は、 1.19×10^{-3} substitutions/site/yearであり、HRV-Aでは 6.50×10^{-4} substitutions/site/year、HRV-Bでは 2.33×10^{-3} substitutions/site/year、HRV-Cでは 3.70×10^{-3} substitutions/site/yearであった。さらに、株間の*p*-distanceを計算したところ、それぞれHRV-Aでは0.205±0.033、HRV-Bでは0.204±0.029、HRV-Cでは0.256±0.046であった。

RSVは、739検体中55株が検出された(7.4%)。検出された患者の年齢は1.5±1.5歳(平均値±標準偏差)であった。これらの株を系統樹解析した結果、RSV-Aは1947年頃、RSV-Bでは1953年頃に分岐していることが分かった(Fig.2)。さらに、分子進化速度は、RSV-Aでは 3.63×10^{-3} substitutions/site/yearであり、RSV-Bでは 4.56×10^{-3} substitutions/site/yearであった。さらに株間での*p*-distanceはそれぞれ0.013±0.009、0.053±0.030であった。

これらの結果から、HRV-Cの株間の遺伝学適距離(*p*-distance)は長く、多数の遺伝子型に分類されることがわかった。一方、RSVの株間の*p*-distanceは比較的短く、少数の遺伝子型のウイルスが近年流行していたことが示唆された。

D. 考察

時系列系統解析が可能なMCMC法を用い、

本邦で急性呼吸器ウイルス感染症から検出されたヒトライノウイルス *VP4/VP2* 領域およびRSウイルス *G* 遺伝子の時系列系統解析、解析遺伝子部位の相同性解析、*p*-distance 解析、positive selection 解析および塩基置換速度解析を行った。その結果、HRV-A およびHRV-C の起源は約 20,000 年、RSV は、約 150 年にさかのぼることが推定された^{8,9}。また、HRV-C 株間の *p*-distance は長く(<0.2)、多数の遺伝子型に分類されることがわかった。一方、RSV の *p*-distance は比較的短く(>0.06)、少数の遺伝子型のウイルスが国内で流行し、種々の呼吸器ウイルス感染症に関与していたことが示唆された⁹。

HRV は通常感冒(common cold)の主要な原因ウイルスであるが、最近の見知によれば、気管支炎や肺炎などの下気道炎を引き起こすことも報告されている。また、気管支喘息の発症や増悪に関与することも示唆されている。しかし、HRV の血清型や遺伝子型は多種類(100 種類)におよび種々の呼吸器感染症に関与する HRV の分子疫学には不明な点が多い。本研究により、上気道炎、気管支炎、喘鳴を伴う気管支炎や肺炎には多数の遺伝子型の HRV-A および HRV-C が関与することが明らかになった。一方、HRV-B は少数の患者からのみ検出された。また、HRV-A および HRV-C の株間の遺伝学的距離は比較的長いことも明らかになった。さらに、HRV-A と HRV-C の起源は 20,000 年以上前にさかのぼれることも明らかになった⁸。以上のことから、本邦においては、長い時間を経て進化した多数の遺伝子型の HRV が種々の呼吸器ウイルス感染症や急性喘鳴に関与していることが推察された。

RSV は、乳幼児に気管支炎、細気管支炎および肺炎を引き起こす主なウイルスである。特に、乳幼児における肺炎入院例の 30～50%は、RSV 感染が原因であることが推定されている¹。また、感染時に急性喘鳴などの気道過敏性の亢進を合併する例も少なくない¹。さらに、慢性肺疾患を有する高齢者

においても重症化することが知られている²。しかし、本邦における RSV 感染症の分子疫学には不明な点が多い。本研究により、種々の呼吸器感染症患者から検出された RSV は、少数の遺伝子型であることと、株間の遺伝学的距離は比較的短いことが推察された⁹。また、各々の subgroup の RSV の起源は約 150 年前に遡ることも明らかになった⁹。さらに、RSV-A の新しい遺伝子型 ON1 も最近出現していることも明らかになった¹⁰。以上のことから、本邦で過去数シーズンに少数の遺伝子型の RSV が種々の呼吸器疾患や急性喘鳴に関与していることが示唆された^{4,5,9,10}。

E. 結論

本邦においては、遺伝学的に多様かつ多数の遺伝子型の HRV が種々の呼吸器感染症に関与していることが明らかになった。その一方、RSV は少数の遺伝子型によって呼吸器感染症の流行が引き起こされていることが推察された。また、検出された HRV は約 20000 年前、RSV は 150 年前までその起源が遡ることも明らかになった。

F. 参考文献

- 1) Domachowske JB., Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection; Immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin Microbiol Rev 12:298-309, 1999.
- 2) Turner, R. B., Couch, R. B. (2007). Rhinovirus. In Fields Virology, 5th edn, pp. 895-909. Edited by Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 3) Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. PLoS One. 2012; 7:e50660.

- 4) Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 61(Pt 3):410-9, 2012.
 - 5) Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, Saito Y, Okabe N, Tashiro M, Kozawa K, Tanaka R, Morita Y, Nishina A, Kimura H. Genotyping and phylogenetic analysis of the major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis. *Jpn J Infect Dis.* 63(6):393-400, 2010.
 - 6) Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214, 2007.
 - 7) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739, 2011.
 - 8) Kiyota N, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Harada S, Kusaka T, Obuchi M, Shimojo N, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of human rhinovirus species A to C detected in patients with acute respiratory infection in Kumamoto prefecture, Japan 2011-2012. *Infect Mol Evol.* 21:90-102, 2013.
 - 9) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo H, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 18:168-173, 2013.
 - 10) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita A, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol.* 57(9):655-659, 2013.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Front in Microbiol.* 4:346, 2013.
 - 2) Kobayashi M, Takayama I, Kageyama T, Tsukagoshi H, Saitoh M, Ishioka T, Yokota Y, Kimura H, Tashiro M, Kozawa K. A new reassortant swine influenza A (H1N2) virus derived from A (H1N1) pdm09 virus isolated from swine. *Emerg Infect Dis.* 19(12):1972-4, 2013.
 - 3) Yamazaki M, Sugai K, Kobayashi Y, Kaburagi Y, Murashita K, Saito N, Niino H, Imagawa T, Tsukagoshi H, Kimura H. A child case of hypocomplementemic urticarial vasculitis due to Coxsackievirus type A9. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(1):1-5, 2014.
 - 4) Miyaji Y, Kobayashi M, Sugai K, Tsukagoshi H, Niwa S, Fujitsuka-Nozawa A, Noda M, Kozawa K, Yamazaki F, Mori M, Yokota S, Kimura H. Respiratory severity and virus profiles in Japanese children with acute respiratory illness. *Microbiol Immunol.* 57(12):811-821, 2013.
 - 5) Kiyota N, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Harada S, Kusaka T, Obuchi M, Shimojo N, Noda M, Kimura H. Genetic

- analysis of human rhinovirus species A to C detected in patients with acute respiratory infection in Kumamoto prefecture, Japan 2011–2012, *Infect Mol Evol.* 21:90-102, 2013.
- 6) Abe M, Tahara M, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, Fukuhara H, Mizuta K, Maenaka K, Ami Y, Esumi M, Kato A, Takeda M. TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol.* 87(21):11930-11935, 2013.
 - 7) Matsuda S, Nakamura M, Hirano E, Kiyota N, Omura T, Suzuki Y, Noda M, Kimura H. Characteristics of human metapneumovirus infection prevailing in hospital wards housing patients with severe disabilities. *Jpn J Infect Dis.* 66(3):195-200, 2013.
 - 8) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita A, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol.* 57(9):655-659, 2013.
 - 9) Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M. Elevated macrophage inflammatory protein 1 α and interleukin-17 production in an experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 161(2):129-137, 2013.
 - 10) Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Shimizue Y, Ito S, Aokia Y, Ikeda T, Abiko C, Kuroda M, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: Findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol.* 58(1):188-193, 2013.
 - 11) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo H, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 18:168-173, 2013.
 - 12) Saraya T, Mikoshiba M, Kamiyama H, Yoshizumi M, Tsuchida S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Terada M, Tanabe E, Tomioka C, Ishii H, Kimura H, Kozawa K, Shiohara T, Takizawa T, Goto T. Evidence for reactivation of human herpes virus 6 in generalized lymphadenopathy in a patient with drug induced hypersensitivity syndrome. *J Clin Microbiol.* 51(6):1979-1982, 2013.
 - 13) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections based on virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 66(2):140-145, 2013.
 - 14) Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S, Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C detected from the patients with acute respiratory infection in Japan. *J Med Microbiol.* 62, 610-617, 2013.
 - 15) Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of

fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* in press.

- 16) Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene* in press.
- 17) Abiko C, Mizuta K, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Noda M, Kimura H, Ahiko T. An outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections, in the 2011-12 winter season in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 66(1):76-78, 2013.
- 18) Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, Tanaka R, Tsukagoshi H, Kimura H. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 66(1): 56-59, 2013.
- 19) Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ishioka T, Mizuta K, Noda M, Morita Y, Ryo A, Kozawa K, Kimura H. Seroepidemiology of scaffold coronavirus (SAFV) genotype 3 in Japan. *J Infect.* 66(2):191-193, 2013.

2. 学会発表

- 1) Miyaji Y, Kobayashi M, Sugai K, Tsukagoshi H, Niwa S, Fujitsuka-Nozawa A, Noda M, Kozawa K, Yamazaki F, Mori M, Yokota S, Kimura H. Severity of respiratory signs and symptoms and virus profiles in Japanese children with acute respiratory illness. *Asia Pacific Congress of Asthma, Allergy, and Clinical Immunology (APCAACI)*, 2013; Nov 14-17, Taipei, Taiwan.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

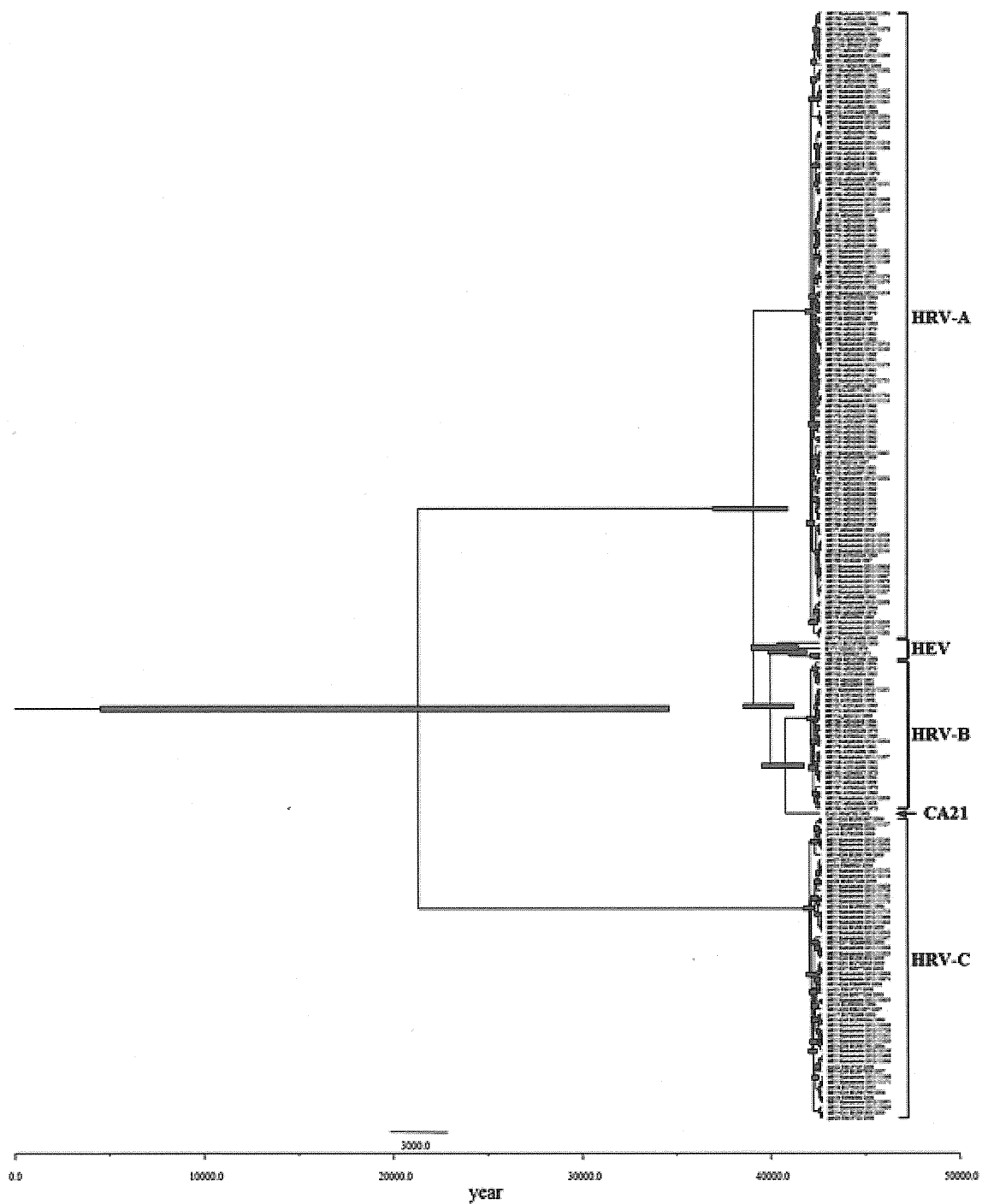


図1 HRV 分子系統樹(VP4/VP2 領域)

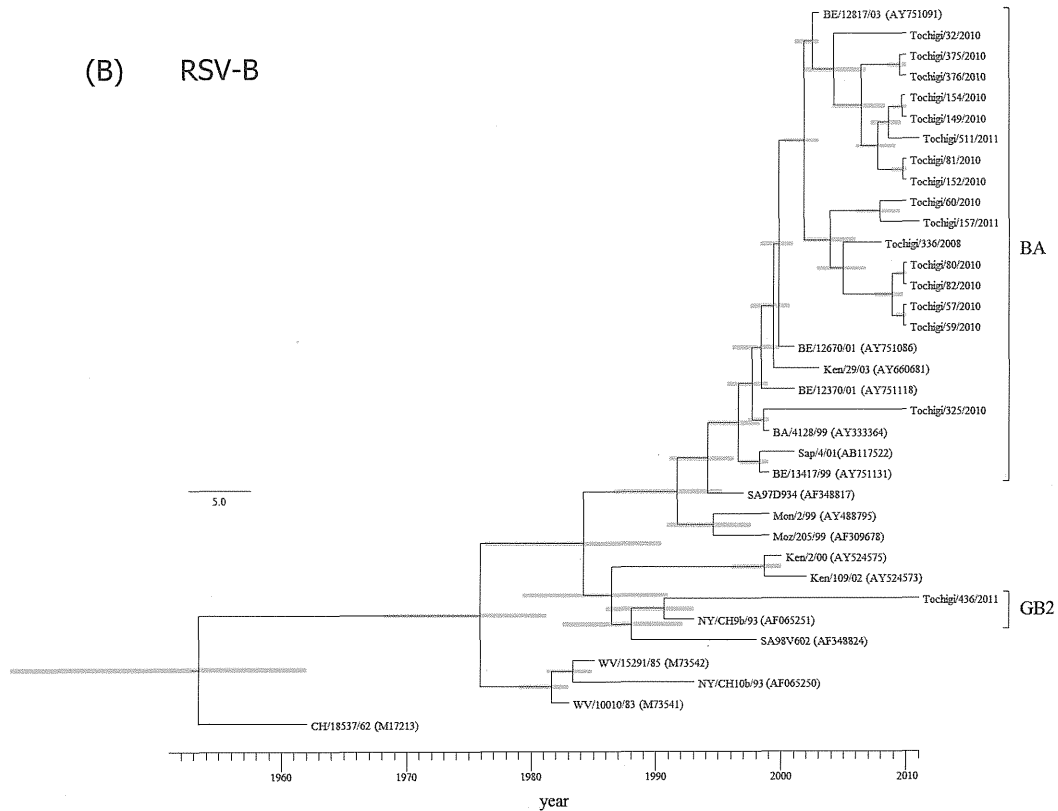
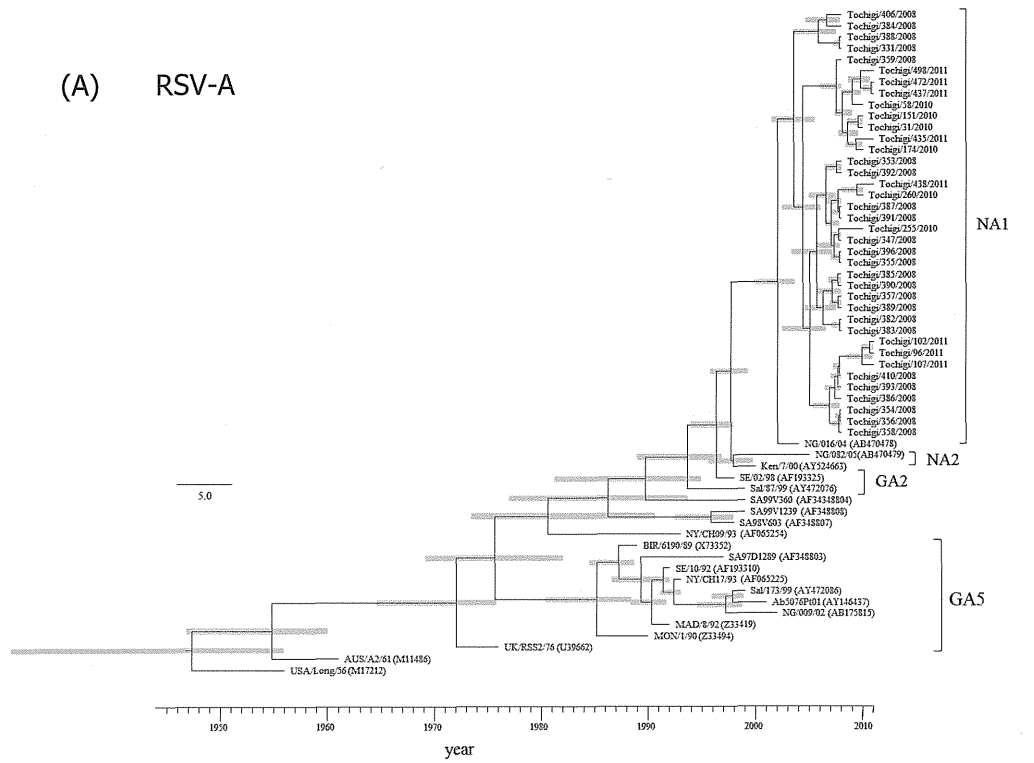


図2 RSV分子系統樹(G遺伝子)

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症 研究事業）
分担総合研究報告書

感染症発生動向調査における迅速かつ網羅解析が必要な検体の収集
および地研間の網羅解析ネットワークの構築

研究代表者

黒田 誠 国立感染症研究所

分担研究者

小澤 邦壽 群馬県衛生環境研究所

研究協力者

丹羽祥一 佐々木佳子 塚越博之 斎藤美香 吉住正和 群馬県衛生環境研究所

研究要旨

次世代シーケンサー (NGS)は大量の核酸配列を網羅的に解読することができるため、従来法では特定できないウイルスも塩基配列から検出することができる。したがって、迅速・網羅病原体解析法を基盤とした感染症対策ネットワークシステムの構築には有用な機器である。特に地方衛生研究所 (地研)における感染症発生動向調査等における病原体網羅解析のニーズは極めて高い。本研究では、まず NGS を活用して、臨床検体からウイルスの遺伝子がどの程度検出できるか検討を行った。その結果、分離株よりは少ないが検出が可能であることが分かった。

A. 研究目的

地方衛生研究所 (地研)では、感染症発生動向調査事業をはじめとして多くの感染症における病原体の特定を行っている。特に、集団発生などにおいて患者の実像とともに病原体を特定することは、早期の対応を可能にするため、解決への有効な手段である。しかしながら、感染症が特定される検体は、およそ 50%程度であり、多くの不明症例が存在していることから網羅的病原体解析のニーズは極めて高い。

近年、遺伝子解析技術は急速に発展している。中でも次世代シーケンサー (NGS)は、核酸塩基配列を偏見無く網羅的に解読することができる。NGS は、従来から行われてきた(RT-)PCRなどで同定が困難であった易変異性 RNA ウィルスや未知の病原体に対しても有用である。そこで、本研究では NGS を活用し1次スクリーニングとして臨床検体から直接病原体の網

羅的遺伝子検出を試み、不明症例を迅速に究明する方法について検討を行った。

B. 研究方法

感染症発生動向調査事業により分離されたヒトメタニューモウイルス (HMPV)および HMPV 集団発生事例において採取された咽頭拭い液を使用した。ウイルス RNA は、QIAamp Viral RNA Mini kit[®] (QIAGEN)を carrier RNA を入れずに使用した。得られた RNA を Qubit (Invitrogen)で定量し、ScriptSeq-v2 RNA-Seq Library Preparation Kit[®] (Epicentre)にてライブラリーの作成を行いアガロースゲル電気泳動にて目的の遺伝子だけを精製した。得られたライブラリーを Miseq Reagent kit v2[®] (Illumina)を用いて Miseq[®] (Illumina)により網羅的遺伝子配列の読み取りを行った。解読リードに内在するヒトゲノム配列を削除し、残った解読リードを用

いて相同性検索 (blastn および blastx)を行い、病原体の検索を行った。得られた結果を MEGAN にて類似性が見られた生物種の一覧図を作成した。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく塩基配列の解析は行わなかった。

C. 研究結果

HMPV 分離株からは、リード数 135,887 本の解読リードを取得した。その中で類似性が見られた生物種は、61316 本のリードであった。ウイルスに関連するリードの割合は、20.9%であり、そのうち HMPV の割合 95.8%であった (図 1A)。一方で、臨床検体からはリード数 938,586 本の解読リードを取得した。その中で類似性が見られた生物種は、938,586 本のリードであった。ウイルスに関連するリードの割合は、20.1%であり、そのうち HMPV の割合 99.6%であった (図 1B)。これらの遺伝子を詳細に解析した結果いずれのウイルス関連遺伝子からも HMPV 遺伝子が多く検出された。

D. 考察

本研究により、ウイルス分離株、臨床検体ともにでは得られたリードの中の約 20%が目的とするウイルスの遺伝子であったことから、RT-PCR で陽性となっている臨床検体であれば分離株とほぼ同様に詳しく遺伝子を調べることが可能であることが分かった。

E. 結論

本研究により、分離株と同様に臨床検体からウイルス遺伝子を検出する事が可能であることが示唆された。今後、NGS を活用して多くの不明症例を解析することにより、原因となる病原体の検索を行っていく予定である。

F. 参考文献

1. Yorita KL, Holman RC, Steiner CA, Effler PV, Miyamura J, Forbes S, Anderson LJ, Balaraman V. Severe bronchiolitis and respiratory syncytial virus

among young children in Hawaii. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26(12):1081-8.

2. Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet.* 2010; 376(9743):826-34.

G. 研究発表

論文発表

1. Miyaji Y, Kobayashi M, Sugai K, Tsukagoshi H, Niwa S, Fujitsuka-Nozawa A, Noda M, Kozawa K, Yamazaki F, Mori M, Yokota S, Kimura H. Respiratory severity and virus profiles in Japanese children with acute respiratory illness. *Microbiol Immunol.* 2013;57(12):811-21.
2. Tsukagoshi H, Ishioka T, Noda M, Kozawa K, Kimura H. Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma. *Front Microbiol.* 2013;4:278.
3. Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol.* 2013;57(9):655-9.
4. Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 2013;18:168-73.

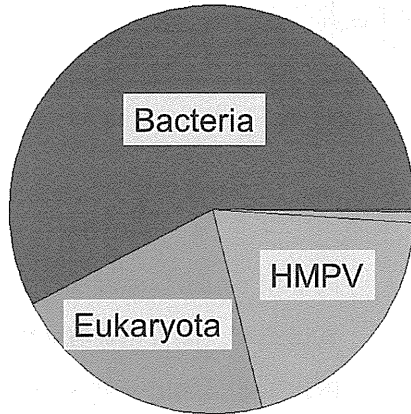
- ### H. 知的財産の出願・登録状況
- なし。

I. その他
謝辞

ゲノム解析において多大なご支援をいただ

きました国立感染症研究所病原体ゲノム解析
研究センターの皆様に深謝致します。

(A)



(B)

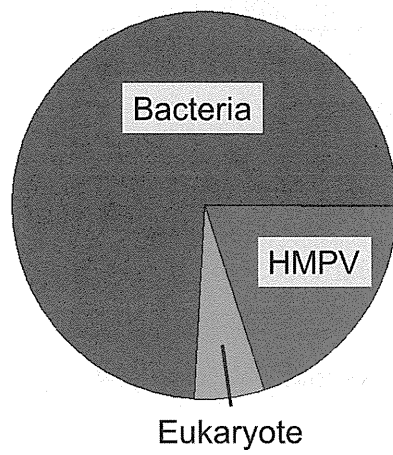


図1 HMPV 分離株および咽頭拭い液からの網羅的病原体検索 (検出された生物種の割合)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした
感染症対策ネットワーク構築に関する研究」

分担研究報告書

研究分担者

調 恒明（山口県環境保健センター）

研究協力者

戸田昌一（山口県環境保健センター）

岡本玲子（山口県環境保健センター）

村田祥子（山口県環境保健センター）

富田正章（山口県環境保健センター）

高橋徹（山口県立総合医療センター）

内田正志（徳山中央病院）

門屋亮（山口赤十字病院）

鈴木英太郎（鈴木小児科）

河野祥二（下関市民病院）

佐藤穰（国立病院機構関門医療センター）

研究要旨

山口県環境保健センターに、今年度初めて次世代シーケンサー（NGS）を導入した。NGSによる解析技術を習得するため、山口県環境保健センターの職員を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに派遣した。本研究の目的は、原因不明の感染症の患者検体のメタゲノム解析によりその病原体を同定することにある。初年度である今年度は、臨床検体のメタゲノム解析によりウイルスの検出が可能である事を確認する目的で、すでにPCR法によりウイルスを同定する事の出来ている臨床検体のメタゲノム解析を行い臨床検体からの病原体同定を試みた。対象としては、これまでゲノム情報が少ないParainfluenza 4型について、分離されたウイルス培養上清およびそれが由来する臨床検体の解析を行い、NGSを用いて全ゲノム解析配列を得た。

A. 研究目的

近年、医療現場において感染症の重要性が高まっている一方、重症例、死亡例において原因病原体が同定されていない例は多い。2013年1月に初めて我が国における患者の発生が報告された重症熱性血小板減少症候群（SFTS）では、NGSにより病原体

が同定された。SFTSは、ウイルスの遺伝子配列の解析により日本に古くから存在していたと考えられており、NGS技術によって同定が可能になった例と思われる。

本研究では、これまで病原体発生動向調査事業とは別に、山口県環境保健センターにおいて実施してきた調査研究による病原

体サーベイランスの検体の中から原因不明となった検体および協力基幹医療機関において原因不明感染症と考えられた検体についてNGS解析を行い、新規の病原体を同定することを目的として研究を行う。研究1年目である今年度は、臨床検体のメタゲノム解析により病原体を同定できるかを検証するために、既にウイルスが同定されている臨床検体についてメタゲノム解析によって病原体を検出することを目的とした研究を行った。

B. 研究方法

山口県環境保健センターにおいて呼吸器感染症や原因不明の感染症の患者検体についてPCR法、細胞培養によるウイルス分離を行ってきた。呼吸器感染症の患者から得た臨床検体から分離した Parainfluenza 4a1検体、Parainfluenza 4b3検体についてNGS解析を行った。また、それらの分離株が由来する臨床検体についてNGS解析を行った。

C. 研究結果と考察

1. NGSの導入

山口県環境保健センターでは、2013年に初めてIllumina社製MiSeqを導入した。NGSを用いた解析技術を習得するため、山口県環境保健センターから2名の専門研究員を国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに派遣し、ライブラリーの作成法、配列決定法、解析法について技術習得した。NGS解析に必要な周辺機器、タワー型サーバー、解析用ソフトを導入した。ま

た、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターとG baseレベルのゲノム配列をやりとりする必要があるため、県庁のLANとは独立した個別のインターネット回線を設置した。

2. 分離株の解析結果

Parainfluenzaウイルス感染症は、事例数としてはインフルエンザ、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルスと並ぶ重要な感染症であるが、検査が十分になされていないためこれまで重視されてこなかったが、最近、重症呼吸器感染症患者から検出されると言う報告がなされている。さらに、Parainfluenzaウイルスには1, 2, 3, 4型があるがこれまで4型の検出例は少なく重要視されてこなかった。しかし、我々の病原体サーベイランスでは重症呼吸器感染症患者から多数検出されており重要な感染症と思われる。4型についてはゲノム解析の報告が少ないため、本研究においてゲノム解析を行った。ゲノム解析を行った Parainfluenzaウイルスは、4a1株、4b3株である(表1)。それらの株の由来する患者の臨床症状等を表2に示した。

2-1. Parainfluenza4a ウイルス

これまでに報告されている Parainfluenza4a ウイルスの全ゲノムは2つのみである。そのうち M-25 は古い株でかつ、サンガーシーケンスでの全ゲノム解析である。最初の CDS (NP) が 56nt ほど早く出現しており、最後の CDS(L protein)の後が 45nt ほど短いことから、最

初の 50nt 程度を見逃している可能性が高い。2013 年に報告されたデンマークの株との比較では、ゲノム長及び CDS の位置も同一で、相同性は全ゲノムで 96.9%と高い相同性が見られた。

2-2. Parainfluenza4b ウイルス

Parainfluenza4b ウイルスの全ゲノムの報告は 3 つのみである。strain 68-333 は古い株でかつ、サンガーシークエンスでの全ゲノム解析である。68-124bp に大きな欠失が見られ、他にも 1 塩基挿入が数カ所見られる。strain 04-14 (Cairo online only) も、同様に大きな欠失が見られる。2009 年に全ゲノム配列決定された SKPIV4 (2004 年カナダ採取検体からの分離株) と今回決定した 3 株は、ゲノム長、CDS の位置もほぼ同一であった。ただし、今回決定した 3 株の PIV4b のうち、ind5 及び ind6 の平均カバレッジがそれぞれ、137.77 と 180.30 であり、最初の ACCAA が読めてない可能性がある。ind7 は平均カバレッジが、205.31 で配列決定に信頼性があると思われる。PIV4a の ind4 の平均カバレッジは 629.15 であり、この 3 株については、配列の信頼性について再検討が必要と思われる。平均カバレッジが最も高かった ind7 と SKPIV4 の相同性は全ゲノム配列で 95.65%であった。

なお、今回決定した 3 株の相同性を比較すると、Ind5 と Ind6 で 95.54%、Ind5 と Ind7 で 95.48%、そして、Ind6 と Ind7 で 99.53%であり、Ind5 のみの相同性が低か

った。なお、Ind5 は、H23 (2011) 年の株であり、Ind6 及び Ind7 は、H24 (2012) 年の株である。流行年の 1 年のずれによる配列の相違についても今後解析の必要がある。一方、Ind5 の平均カバレッジが低かったことで、正確に読めておらず、相同性が低くなっている可能性も否定できない。

3. 臨床検体の解析結果

Parainfluenza ウイルスが分離された臨床検体のメタゲノム解析を行った (表 2 H24-Shu-42 を除く)。感染研病原体ゲノム解析研究センターで、ヒトゲノム配列を削除、残った配列についてデータベース上の配列に対して BLAST を行った。その結果、Parainfluenza ウイルスの配列が含まれることが示された。この結果から今後、原因不明の感染症患者の臨床検体の解析により原因解明が可能である事が示唆された。

D. 結論

1. 分離株の解析

Parainfluenza ウイルスは分離、配列情報に乏しい。今回、日本で分離された 4 つの分離株の全ゲノム配列を初めて決定した。また、山口県環境保健センターにおける過去 4 年間の調査研究病原体サーベイランスの検体のなかにパラインフルエンザウイルスが検出された検体が 114 検体含まれているため、これらについて PCR 法でウイルス遺伝子を増幅し NGS 解析を行うことによって多くのフルゲノムに近い配列を解析することを検討する。

2. 臨床検体の解析

臨床検体については、山口県環境保健センターにおける呼吸器疾患を中心とした過去4年間の調査研究病原体サーベイランスの検体について、丹念に呼吸器ウイルスを検索してきた。その中で既知のウイルスを検出できなかった検体が465検体あり、この中から疫学的リンクがあり病原体を検出できる可能性が高いと思われる検体等についてNGS解析を実施していきたいと考えている。

3. 原因不明重症感染症の解析について

来年度以降は、主に山口県内の基幹病院から原因不明重症感染症患者検体を積極的に収集しNGS解析を行っていく予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

論文発表

1. Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013;63(2):194-200.
2. Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol*. 2013;57(9):655-9.

学会発表

国際学会

なし

国内学会

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表 1. NGS 解析を行ったウイルス分離株

Index	Sample ID	Passage	Clinical sample	RT-PCR results
Ind4	S-22-228	VeroE6 3rd	Throat swab	PIV4a
Ind5	S-162	VeroE6 3rd	Nasal	PIV4b
Ind6	ST-26-53	VeroE6 2nd	Nasal	PIV4b
Ind7	H24-Shu-42	VeroE6 3rd	Throat swab	PIV4b

表 2. Parainfluenza ウイルスが分離された臨床検体

検体情報										
H C	Sample ID	医療 機関	疾患名	年 齢	月 齢	性 別	検 体	発病日	検体採取 日	備考
宇 部	S-22-228	S 小 児科	喘息性気 管支炎	0	1 1	M	拭 い 液	H22.12.1 0	H22.12.1 0	咳 嗽、喘 鳴、入院 中、WBC: 15,800、 CRP: 5.2
宇 部	S-162	S 小 児科	気管支喘 息発作	1	6	M	鼻 汁	H23.7.5	H23.7.7	発 熱 37.5℃、 咳、喘鳴、 hMPV(-)、 RS(-)
下 関	ST-24-53	S 市 民病 院	無菌性髄 膜炎 気管支炎	0	1 0	M	鼻 汁	H24.9.18	H24.9.19	発熱 39℃、 熱性痙攣、 髄膜炎、そ の後、気管 支炎症状、 マ イ コ IgM(±)
周 南	H24-Shu- 42	福祉 養施 設護	急性上気 道炎	3 5	1	M	拭 い 液	H24.11.2	H24.11.7	発 熱 37.7℃、基 礎疾患：脳 性麻痺、経 過観察中、 福祉養護 施設集団 発生

Parainfluenza 4a, b 分離株のゲノム配列

- isolate 1: Parainfluenza 4a
- isolate 2: Parainfluenza 4b
- isolate 3: Parainfluenza 4b
- isolate 4: Parainfluenza 4b

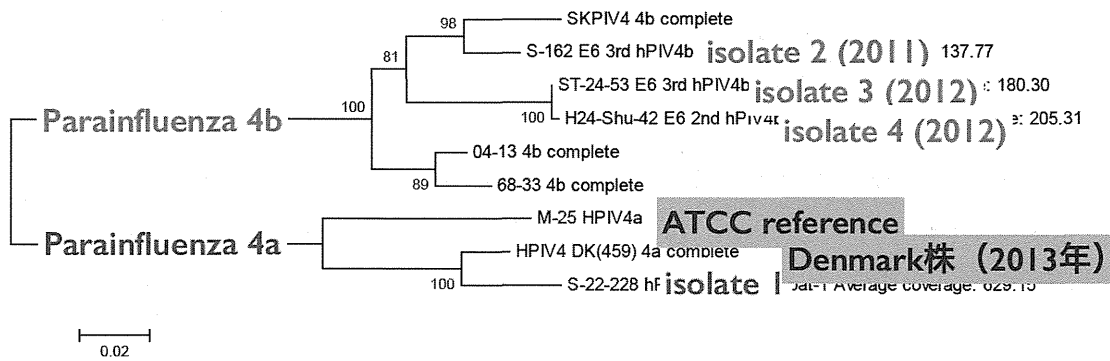


図 1. Parainfluenzavirus 分離株のゲノム配列による系統樹解析

Parainfluenza 4b が検出された臨床検体のメタゲノム解析

ヒトゲノム配列を差し引いた後BLAST

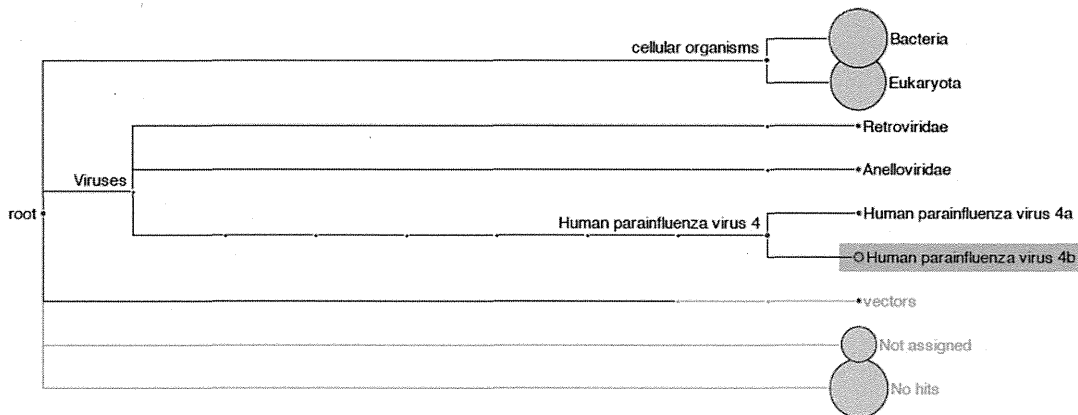


図 2. 臨床検体のゲノム解析

網羅解析を必要とする感染症患者検体収集および網羅解析ネットワークの構築：
富山県衛生研究所

研究分担者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究協力者：小淵正次、滝澤剛則、名古屋真弓、板持雅恵、稲崎倫子、嶋 一世、
綿引正則、磯部順子、木全恵子、清水美和子、増田千恵子、金谷潤一
（富山県衛生研究所）

研究要旨：地方衛生研究所では、感染症発生動向調査の中で臨床ないし食品等の検体で病原体診断を行っているが、残念ながら全ての検体の検査が陽性になるわけではない。次世代シーケンサは、大量の核酸配列を網羅的に解読することができることから、これまで病原体を特定できずに不明としていた感染症疑いの患者の検査診断に役立つことが期待できる。地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用について、今回、薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出、病原微生物不明の感染症を疑う患者検体の解析、そして少量の便検体からでも検査が可能かどうかについて検討した。結果、変異インフルエンザウイルスは検出できず対照と同様の変異率であった。感染性胃腸炎患者の検体からサポウイルスが検出でき、最初に用いたプライマー配列とは変異があったため原因不明となったことが判明した。また少量の便検体でも十分検討可能であった。これらのことから、その方法や大量のリードの解析への対応が可能となったので、今後さらに検体を解析していくことで地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用方法を明かとし、解析方法の確立とともに、国立感染症研究所と地方衛生研究所とのネットワークの意義についても検討していきたい。

A. 研究目的

地方衛生研究所では、感染症発生動向調査の中で臨床ないし食品等の検体で病原体診断を行っている。感染症法で1類から5類に定められている100種類以上の感染症のうちのいくつかを対象として病原体検査マニュアルが準備されている。しかし、もし検査対象検体が感染症を原因としていても、残念ながら全ての患者検体の検査が陽性になるわけではない。これには種々の理

由が考えられるものの、一つはその方法論にもあると思われる。次世代シーケンサは、従来のシーケンサと異なり、大量の核酸配列を網羅的に、つまり病原体核酸には非特異的に解読することができることから、これまで病原体を特定できずに不明としていた感染症疑いの患者の検査診断や病原体遺伝子の変異の検出に役立つことが期待できる。そこで地方衛生研究所が感染症発生動向調査において次世代シーケンサの応用を

検討する意味でも、病原微生物が不明であった検体での網羅的解析や耐性ウイルスの検出にどのように使えるかについて、以下の3点について検討した。

1) 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出: 従来のキャピラリーシーケンサによる PCR 産物のシーケンスでは、ウイルス試料中のごくわずかな変異ウイルスまでは解析することはできない。そのため、これまではウイルス遺伝子のクローニングを行い、個々のクローンについて塩基配列を解析する必要があった。しかし、次世代シーケンサが開発されたことで、PCR 産物のディープシーケンスによりマイナーポピュレーションを検索することが可能になった。そこで、本研究では抗インフルエンザウイルス薬投与中の薬剤耐性ウイルスの発生の有無を調べるため、次世代シーケンサ (MiSeq、Illumina 社) を用いて、投薬前後の患者検体から薬剤耐性ウイルスの検出を試みた。

2) 病原微生物不明の感染症を疑う患者検体の解析: 平成 23~24 年度において、当ウイルス部に無菌性髄膜炎、脳炎・脳症等の臨床診断により搬入された検体の 57%、また、感染性胃腸炎の散発事例および集団発生事例として搬入された検体のそれぞれ 31% および 11% でウイルスが検出されずに原因不明となっている。次世代シーケンサを用いることにより原因不明検体の病原ウイルスが特定できれば、今後の診断、治療、予防等の感染症対策に有用な情報が得られるものと考えられる。しかしながら、次世代シーケンサを用いた病原体検索は、一部の研究機関が研究として開始しているのみで、検査法が確立しているわけではな

い。そこで、上記診断名で当ウイルス部に搬入され、病原体が特定されなかった過去の検体を対象にして、次世代シーケンサを用いて解析し、検体の処理条件の設定や、その解析の有用性等を検証することを目的とした。

3) 少量の便検体でも次世代シーケンサで検査が可能か: 地方衛生研究所は感染症や食中毒患者から糞便検体が搬入されて検査を行っているが、検体にはいろいろの制約があって少量しか得られない場合があるため、まず、検討を行った。

B. 研究方法

1) 富山県内の 5 医療機関において、2012/13 年シーズンにインフルエンザで入院加療した小児患者 7 名から、ペラミビル投与前後 (オセルタミビル併用患者 1 名) に鼻腔ぬぐい液を採取した。検体から RNA を抽出し、アダプタ配列を含む NA 遺伝子特異的プライマーを用いて、既知の薬剤耐性変異部位のなかで高頻度に見出される E119V ならびに R292K (N294S) の近傍約 100 塩基の領域を one step RT-PCR 法により増幅した。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製して DNA ライブラリを調製した。次いで、MiSeq Reagent Kit (300 Cycle) を用いてシーケンスを行い、得られたリードの SNP 解析により E119V、R292K および N294S の変異率を算出した。

2) 無菌性髄膜炎、脳炎・脳症、感染性胃腸炎が疑われ、当ウイルス部に搬入された検体で、行政検査によりウイルスが検出されなかった検体を対象とした。無菌性髄膜炎、脳炎・脳症例の検体は、2008 年から

2012年にそれぞれ8検体、6検体から採取された髄液を用いた。いずれも、単純ヘルペスウイルス1型及び2型、ヒトヘルペスウイルス6型7型、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エンテロウイルス、ムンプスウイルス、日本脳炎ウイルスを対象としたPCR検査あるいは分離培養検査でウイルスが検出されなかった。感染性胃腸炎は、2013年4月に老人保健施設で発生した集団発生事例から採取された10%便乳剤6検体を用いた。検体からは、遺伝子検査あるいは迅速診断キットでノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスが検出されなかった。各検体からRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, キャリアRNA無添加のBuffer AVLを使用)によりRNAを抽出し、ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation kit (Epicentre)を用いてRNAライブラリを作製した。ライブラリをAMPure XP Purification (Beckman coulter)により精製後、DNA濃度を約11pM/ランに調整し、MiSeq Reagent kit nano 300 Cycles PE (Illumina)を用いて、MiSeqにより塩基配列の解読を行った(paired-end, 120 cycles)。

3) 便検体は、食中毒関連で収集した便検体16検体で、うち、Cary-Blaire培地に埋め込まれた少量便検体(CB便)8検体が含まれる。便のDNA抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いた。抽出したDNAの濃度測定は、NanoDropおよびQubitを用いた。NGS解析用DNAライブラリの作製には、MiSeq用のDNAライブラリ作製キット、NexteraXTライブラリキットを使用した。作製は、製品キットのプロトコール通りに実施した。

ル通りに実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、富山県衛生研究所倫理審査委員会に申請し承認された(平成23年度受付番号1および変1、平成25年度受付番号1-5)。

C. 研究結果

1) ペラミビル投与前後に採取した患者7名の14検体において、E119V、R292KおよびN294Sの各部位で184,121~628,054リードの塩基配列が得られた(図1)。これらのリードをSNP解析したところ、それぞれの部位で0.01~0.14%の変異が検出された。また、N294Sの変異率は他の部位と比べてやや高い傾向がみられた。しかし、投薬前後の検体で変異検出率に大きな違いは認められなかった(図1)。さらに、陰性対照として用いた薬剤感受性ウイルスのNA遺伝子断片を挿入したプラスミドDNAの変異率もウイルス検体とほとんど同じであった。

2) Miseqにより解読された1検体あたりのリード数は、髄膜炎では19,340~55,772(平均33,915)、脳炎・脳症例では16,416~55,280(平均33,071)、感染性胃腸炎は27,626~56,876(平均37,711)であった。MePICを用いたメタゲノム解析により、ヒト以外のゲノムにヒットしたリード数は、1検体あたり髄膜炎では356~21,771(平均5232)、脳炎・脳症例では352~5,962(平均4047)、感染性胃腸炎では1,414~8,343(平均4,772)であり(表1~3)、平均すると総リード数

の約 12%であった。いずれの検体からも、細菌由来の遺伝子配列が最も多く検出された(表 1~3)。特に、脳炎・脳症 1 例(検体番号 5)においてバクテリオイデス属の検出が多かったが(表 2)、発症との関連は不明である。一方、ウイルスの配列に類似した配列が 1 サンプルあたり 11~114 リード検出されたが(表 1~3)、サポウイルス(表 3)以外は、ほとんどはバクテリオファージかあるいはライブラリ作製キットや精製キットの試薬に混入しているウイルス遺伝子の類似配列と考えられた。感染性胃腸炎の 3 検体から 2~6 リードのサポウイルスが検出された(表 3)。いずれのリードも、食中毒事例(2012 年 5 月、名古屋市・万代)から検出されたサポウイルス(Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN : SaV GV.2)のゲノムの塩基配列の一部と 93~99%一致した。同一事例由来の 3 検体から共通に SaV GV.2 が検出されたことから、本事例は SaV GV.2 が原因であった可能性が考えられた。

3) 便検体から全 DNA の抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit のプロトコルに準拠して、出発量は 0.5g とした。Cary-Blaire 培地に保存されていた便検体でも Cary-Blaire 培地も含めて 0.5g を使用した。結果を図 2 右表に示した。抽出した DNA 量の測定については、NanoDrop では基本的に OD260 値から DNA 量を換算しているが、Qubit は 2 本鎖 DNA に特異的に親和性の高い蛍光物質を混合して 2 本鎖 DNA を特異的に定量する。実際、定量値は NanoDrop より低かった。また、18 検体中、CB 便検体の 1 検体からは検出されなかつ

た。一方で残りの検体は、0.059~16.75ng/μl であり、通常便検体と CB 便の差はみられなかった。NexteraXT キットによる DNA ライブラリの作製のプロトコルには、0.2ng/μl 濃度の DNA 5μl 必要である。そこで、この濃度の確保できた 14 検体についてライブラリを作成した。最終的に作製した 50μl の反応液の 2.5μl を、1.5%アガロース電気泳動を用いて評価した。結果は図 2 右に示した。合成量が少ない検体(#3,11)はあったものの、他は 500~1,000bp 程度までの DNA が合成されていた。

D. 考察

今回の解析では、ペラミビル投与患者 7 名の鼻腔ぬぐい液検体について、次世代シーケンサを用いて PCR 産物のディープシーケンスを行い、薬剤耐性変異ウイルスの検出を試みた。しかし、投薬前後で変異率に大きな差はみられず、薬剤耐性ウイルスの発生は確認できなかった。ほかの部分における変異については今回、調べていない。さらに、陰性対照でみられた変異率から、検出された変異は PCR 反応に用いた DNA ポリメラーゼのヌクレオチド取込みエラーやシーケンサの検出エラーによるものと考えられた。以上のことから、PCR 産物のディープシーケンスにおける変異検出限界はおおよそ 0.1%であることが示された。今後、MiSeq の変異検出限界について遺伝子変異を有する試料等を用いてさらなる検討を行う予定である。

病原体が不明であった臨床検体から解析したが、検体あたりの総リード数が数万であったため、検出感度を上げるために、総

リード数を一桁以上増やす必要があると考えられた。また、短いリードによるベクター配列（インデックス配列）の混入が非常に多い検体があり、ゲルの切り出し等により 100 塩基長以上の断片を精製すべきと考えられた。今回、感染性胃腸炎の集団発生事例から SaV GV.2 が検出された。リアルタイム PCR による遺伝子検査でサポウイルスが陰性であったのは、既報(J Med Virol 78:1347-1353 (2006)) のプライマーが SaV GV.2 との相同性が低く、反応しなかったためと考えられる。同一事例の複数の検体から共通の配列が検出される場合は、少数のリードでも診断に有用であると考えられた。しかし網羅的解析で候補の病原体が検出されたと考え、最終的には、特異的な PCR や臨床症状を含めた総合的判断が必要と思われる。

次世代シーケンサの解析は、①検体からの DNA あるいは RNA の抽出、②塩基配列決定原理（装置）に応じたサンプル調製、③解析データの処理、の 3 つの工程で実施される。①については、存在する DNA をすべて抽出して解析する DNA-seq と RNA ウイルスや遺伝子転写産物としての RNA を解析する RNA-seq に大別される。②については、最近ではイルミナ社の次世代シーケンサが普及しているとされるが、いずれも装置に応じたサンプル調製が必要である。③については、膨大な配列情報を処理するための技術が必要となりなかなかハードルが高かった。今回、MePIC が利用できるようになり、このハードルが低くなると思われる。本年度は、①に関する要素技術について検討した。その目的は、DNA や RNA を抽出する必要がある臨床検体は、通常は

診断や治療目的で、医療機関で採取されるものであり、仮に不明症例の検体として次世代シーケンサを用いた解析をするにしても、検体の状態に依存することが充分予想される。そこで、今回は、集団食中毒事例で収集された便検体及び少量便検体として Cary-Blair 培地入り便検体から DNA を抽出し、MiSeq で解析可能な DNA ライブラリが作成できるかどうか検討した。その結果、ライブラリは合成されていることが確認された。今後は、このライブラリを MiSeq で解読し、さらに評価したい。今回の便検体は、行政検査のなかで収集されたものであるが、検査目的で既に何回かの凍結融解を繰り返しており、検査する検体として、品質は高くはないと思われるが、一方で、Cary-Blair 便の利用は、本検査の幅を広げ、一患者採取日の異なる検体で比較することにより、原因菌の推定が容易になると期待される。

謝辞：本研究の実施にあたり、検体の採取にご協力いただいた富山市民病院小児科の金田 尚先生、富山赤十字病院小児科の津幡眞一先生、黒部市民病院小児科の篠崎健太郎先生、高岡市民病院小児科の辻 隆男先生、厚生連高岡病院小児科の粕井正春先生に深謝いたします。

E. 結論

地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用について検討した結果、インフルエンザウイルスの変異の検討が可能であること、感染性胃腸炎患者の検体から既知のプライマー配列とは異なるサポウイルスが検出できたこと、さらに少量の便検体でも十分検

討可能であることが判明した。これらのことから、さらに、次世代シーケンサの利用方法や解析方法の確立とともに、この感染研と地衛研とのネットワークについて検討する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

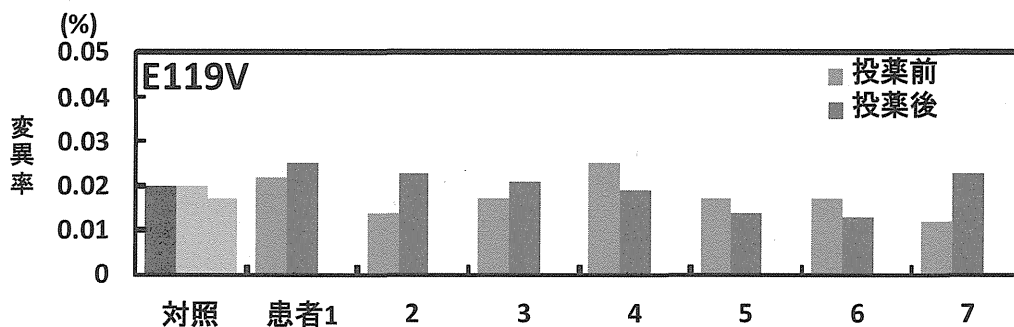
1) Obuchi M, Hatasaki K, Tsubata S, Kaneda H, Shinozaki K, Tsuji T, Kasei M, Konishi M, Inasaki N, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Sata T and Takizawa T.

Detection of Resistant Influenza A(H3N2) Virus in Children Treated with Neuraminidase Inhibitors Using a Next-Generation DNA Sequencer. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 米国デンバー、2013年9月

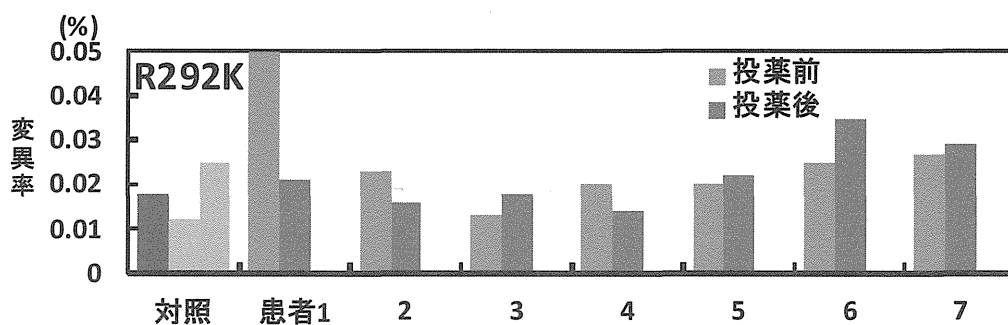
2) 小淵正次、畑崎喜芳、津幡眞一、金田尚、篠崎健太郎、辻 隆男、粕井正春、小西道雄、稲崎倫子、名古屋（小原）真弓、堀元栄詞、佐多徹太郎、滝澤剛則. ノイラミニダーゼ阻害薬投与小児患者における薬剤耐性 A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

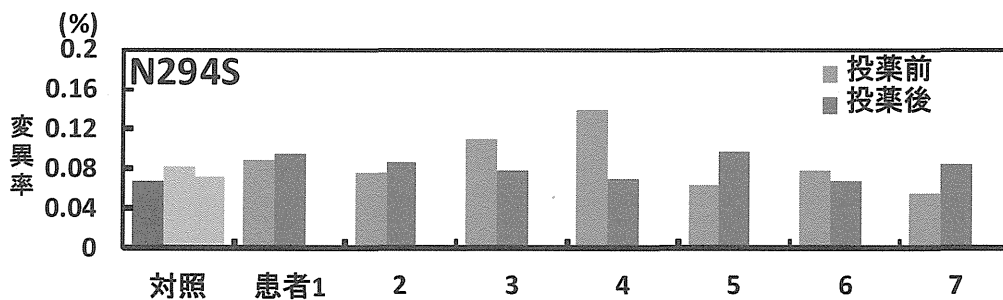
なし



投薬前	変異率	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%
	リード数	283,475	260,926	297,499	280,012	263,018	190,514	281,444
投薬後	変異率	0.03%	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%	0.02%
	リード数	236,330	282,810	218,796	330,959	284,553	291,387	274,049



投薬前	変異率	0.05%	0.02%	0.01%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%
	リード数	520,796	497,307	492,381	516,424	257,427	194,700	231,366
投薬後	変異率	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.02%	0.04%	0.03%
	リード数	628,054	490,324	318,078	252,107	184,121	232,852	213,102



投薬前	変異率	0.09%	0.08%	0.11%	0.14%	0.06%	0.08%	0.06%
	リード数	516,342	492,370	487,514	511,778	271,846	205,543	247,044
投薬後	変異率	0.09%	0.09%	0.08%	0.07%	0.10%	0.07%	0.08%
	リード数	623,094	485,924	315,403	249,488	195,664	247,623	227,085

図1 次世代シーケンサーによるペラミビル耐性A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出

表 1. 無菌性髄膜炎例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス
1	25,792	356	129	0	0	11
2	29,398	3,138	227	0	0	50
3	25,980	4,872	390	3	3	73
4	31,144	946	611	1	1	114
5	44,306	8,572	459	2	2	23
6	55,772	21,771	21,585	1	1	37
7	19,340	1,409	1,297	0	0	16
8	39,590	788	591	0	0	7

表 2. 脳炎・脳症例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス
1	16,416	352	259	0	0	11
2	23,836	3,328	3,170	1	1	84
3	38,010	5,962	5,809	2	2	89
4	30,056	2,371	2,167	1	1	27
5	34,826	6,837	6,746*	0	0	49
6	55,280	5,429	5,289	0	0	76

*Bacteroides 属のリード数 1097 を含む。

表 3. 感染性胃腸炎例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解 析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス (サポウイルス)
1	43,708	6,137	2,590	3	4	16 (6)
2	27,626	1,414	948	0	1	12 (0)
3	30,838	7,052	4,806	0	1	3 (0)
4	38,794	8,343	8,205	1	2	15 (4)
5	28,428	2,509	2,252	1	3	76 (2)
6	56,876	3,174	2,801	0	99	10 (0)

#	ID	Shape	NanoDrop ng/ul	Qubit ng/ul	Prep. DNA Library	Priority	Nextera XT PCR
1	KH0505F	original	6.79	4.97	OK	1	OK
2	TK0427F	original	13.33	9.6	OK	2	OK
3	KM0502F	original	-4.26	0.505	OK	3	?
4	TY0428F	original	-1.77	1.015	OK	7	OK
5	TM0427H	original	-0.49	1.935	OK	6	OK
6	JH0429F	original	38.51	15.4	OK	4	OK
7	JH0505c	Cary-Blair	-4.9	0.001	not	-	✗
8	SH0429F	original	15.41	4.7	OK	5	?
9	KIM428F	original	57.71	9.95	OK	8	OK
10	YM0000c	Cary-Blair	-0.56	2.53	OK	9	OK
11	KN0000c	Cary-Blair	50.96	15.35	OK	10	?
12	RO0512c	Cary-Blair	14.28	8.7	OK	11	OK
13	RO0506c	Cary-Blair	5.94	3.305	OK	12	OK
14	NK0000c	Cary-Blair	-0.48	1.49	OK	13	OK
15	RY0504c	Cary-Blair	14.78	16.75	OK	14	OK
16	MY0430c	Cary-Blair	-8.42	0.059	not	-	✗

図 2. 便 DNA の定量と NexteraXT によるライブラリーの検定

「迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした

感染症対策ネットワーク構築に関する研究」

研究分担報告書 研究代表者 黒田誠

網羅解析を必要とする感染症患者検体収集および網羅解析ネットワークの構築

研究分担者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	木村 博一	国立感染症研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター

研究要旨

国立感染症研究所と連携し、原因食品が特定されていなかった集団食中毒事例を対象に、次世代シーケンサー (NGS) を用いて胃腸炎起因ウイルス遺伝子の網羅的解析を行うとともに網羅的解析技術の習得に努めた。また、倫理面に配慮し研究を進めるため、検体及び解析データの取り扱い方法について検討した。これらの取組により、国立感染症研究所との間に病原体の NGS による網羅的解析を行うネットワークを構築した。

A. 研究目的

PCR は、感染症や食中毒の病原体検出に広く使用されているが、特定の病原体を検出対象とするため、未知の病原体の検出には応用できない。また、かぜや胃腸炎などの多様な病原体が関与する症候群を対象に病原体の検索を行う場合には複数の反応を並行して行う必要がある。

一方、最近開発された次世代シーケンサー (NGS) は、遺伝子を網羅的に解析することが可能であることから、不特定の病原体を対象とした病原体検査への応用が期待されている。

岩手県環境保健研究センターには NGS が整備されていないため、不明感染症疑

い症例等からの病原体の網羅的解析が行政対応として必要となった場合に、迅速・的確に検査が実施できるよう NGS が整備されている国立感染症研究所 (感染研) との間に病原体の網羅的解析を行うネットワークの構築を目的に研究に取り組んだ。

具体的には、倫理面に配慮した検体の収集方法及び解析データの取り扱い方法について検討するとともに、原因ウイルスを含む食品が特定されていなかった集団食中毒事例を対象に感染研病原体ゲノム解析研究センターおよび感染症疫学センターと連携して NGS による胃腸炎起因ウイルスの網羅的解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象とした集団食中毒事例の概要

平成 25 年 1 月某日の昼に、岩手県内の某飲食店で会食した 5 グループ(参加者 94 名)のうち 4 グループの 40 名が、嘔気、嘔吐、腹痛、下痢を主症状とする食中毒様症状を呈した(表 1)。潜伏時間は、9~57 時間で平均は 33 時間 46 分であった。摂食状況調査の結果、発症状況に食品による偏りは認められなかった。また、提供された食事にカキは含まれていなかった。原因調査では、PCR(リアルタイム RT-PCR 及び RT-PCR)により、調査対象としたグループ A の患者及び飲食店の調理従事者から数種類のノロウイルスが検出された。疫学調査の結果、本事例はノロウイルスによる集団食中毒事例と判断された。しかし、カキが提供されていなかったにもかかわらず患者と調理従事者から数種類のノロウイルスが検出されたことや発症状況に食品による偏りが認められなかったことから、疫学的な因果関係を特定できなかった。

2. 材料

グループ A の患者のうちから RT-PCR によりノロウイルスが検出された 8 検体(患者及び調理従事者から採取した糞便または吐物)を対象とした。

3. 遺伝子の網羅的解析

検査材料 0.05g を 1%SDS 加 TE バッファー 500 μ L に懸濁し、フェノール 500 μ L を添加し振とう後、15,000 rpm、5 分の遠心を行い、上清を回収した。得られた上清から High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche)を用いて核酸を抽出し、Qubit® dsDNA HS Assay Kit(Molecular Probes)により抽出した核酸の

濃度を測定した。

核酸抽出液 9.0 μ L から ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre)を用いて cDNA を作成後、FailSafe™ PCR System(Epicentre)を用いて 15 サイクルの Enrichment PCR により DNA の増幅を行った。増幅産物を MinElute PCR Purification Kit(Qiagen)を用いて精製した後、アガロースゲル電気泳動を行い、250 bp~500 bp のバンドを切り出し、アガロース片から Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を用いて DNA を回収した。回収した DNA の濃度を測定して全ての検体が同じ濃度になるよう調整した後、全ての検体を混合しシーケンス用試料とした。100 倍希釈した遺伝子解析用試料 600 μ L を用い、NGS (MiSeq II, Illumina)にて解析した。なお、シーケンス解析は Metagenome モードで行った。配列データの解析は、BaseSpace(Illumina)に格納されたデータを、MePIC 2(感染研サーバー)で加工し、megaBLAST によりレファレンス配列と照合し、配列を決定した。決定した配列は次の解析用ソフトを用いてさらに検討した。系統樹作成等の解析には MEGAN (Universität Tübingen)を、ショートリードのマッピング・アセンブリには CLC Genomics Workbench(CLC bio)を、アセンブリ結果の評価には Tablet(The James Hutton Institute)を用いた。

(倫理面への配慮)

病原体遺伝子の網羅的解析では主にヒトから採取した臨床検体が解析対象となることから、次により倫理面に配慮し研究を進めることとした。①検体は採取機

関である岩手県環境保健研究センターにおいて暗号を付け匿名化した後、感染研に搬入し網羅的解析を実施する。②網羅的解析データの岩手県環境保健研究センターへの還元にあたっては、ヒトの遺伝子データを削除した後、還元する。③研究に対する倫理審査は、感染研において倫理委員会の審査を受けた。

C. 研究結果

現在、シーケンスデータを解析中であるが、表2に RT-PCR によるウイルス検出状況と NGS によるウイルス検出状況を示した。

対象とした検体は、RT-PCR で、全ての検体からノロウイルスが、1 検体からアイチウイルスが検出された検体である。

NGS による網羅的解析により、全ての検体からノロウイルスとアイチウイルスのリードが検出された。しかし、得られたリード数が少なく、遺伝子型の決定や株間の塩基配列の比較に必要な量の配列データを決定できない検体も多かった。十分な量の配列データが得られたのはノロウイルスが 5 検体、アイチウイルスが 1 検体であった。

D. 考察

因果関係が不明であったノロウイルスを原因とする集団食中毒事例を対象に、因果関係の解明につながる新たな情報を得ることを目的に、NGS による網羅的解析を行った。

その結果、ノロウイルスとアイチウイルスのリードが全検体から得られた。しかし、得られたリード数が少なく疫学的解析に十分な量の配列データが得られない検体が多

く、これまでのところ、因果関係の解明につながるデータは得られていない。

十分な量の配列データを得るためには対象とするウイルスのリード数を増やすことが必要であるが、本村らは、糞便からのノロウイルスの網羅的な解析に特異的なプライマーを用いた PCR 産物を網羅的解析の出発材料としている。

今後は、NGS により得られる検出対象ウイルスのリードを増やせるよう、出発材料の種類や前処理法について検討することが必要と考えられた。また、NGS により得られたデータ解析を円滑に行うため、さらなる解析技術の習得・熟練が必要と考えられた。

E. 結論

国立感染症研究所との間に病原体の網羅的解析を行うネットワークを構築することを目的に、倫理面に配慮した検体の取扱い方法及び解析データの取扱い方法について検討するとともに、感染研と連携して NGS による網羅的解析を実施した。今後はさらなる高度な解析技術習得を行うとともに、検出対象について疫学解析上、十分な量の配列情報が得られるよう網羅的解析の出発材料の種類や検体の前処理方法について検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 患者発生状況

グループ名	摂食者数	患者数	食事のメニュー
A	51	26	わんこそば、弁当
B	31	12	皿盛
C	2	1	わんこそば
D	4	0	わんこそば
E	6	1	わんこそば
合計	94	40	

表2 ウイルス検査状況

番号	検体	被験者	RT-PCR		網羅的解析 (リード数)	
			Norovirus	Aichivirus	Norovirus	Aichivirus
1	糞便	患者	● (GII-4)		1,341 (GII-4)	17
5	糞便	患者	● (GII-2)		12 (GII-2)	4
6	糞便	患者	● (GII-11)		40	1
7	糞便	患者	● (GII-4)		4	1
8	糞便	患者	● (GII-4)		397 (GII-4)	5
9	嘔吐物	患者	● (GII-4)		30	9
10	糞便	調理従事者	● (GII-4)		114 (GII-4)	1
11	糞便	調理従事者	● (GI-4, GII-4)	● (type 1)	2,880	10,046 (type 1)

● : 検出 () : 型

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究分担者 氏 名 舘田 一博 (所 属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
研究協力者 氏 名 青木弘太郎 (所 属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
嵯峨 知生 (所 属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
石井 良和 (所 属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

研究要旨

感染症診療において起因病原体の特定は、適切な治療を行う上で極めて重要である。しかし、培養や特定病原体の遺伝子を検出するこれまでの微生物検査法では起因微生物の特定が困難なことが少なくない。東邦大学医療センター大森病院で、臨床像から感染性心内膜炎が強く示唆されるにもかかわらず、血液培養で細菌が培養されず、その特定に至らなかった症例を経験した。当該患者は、弁置換術が施行されたことから、採取された疣贅および弁組織検体を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析および16s rRNA をコードする遺伝子解析による病原体の検出・同定を試みた。網羅的病原体ゲノム検索の結果、リード数から優勢と思われる主要な菌種は *Streptococcus pneumoniae* と *Abiotrophia defectiva* であった。並行して実施した16S rRNA 解析でも全ての検体から *A. defectiva* の16S rRNA と相溶性の高いDNA塩基配列が確認された。これまでの検査で原因菌が不明とされていた感染性心内膜炎症例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNAの塩基配列を解析することにより、原因菌が *A. defectiva* であることを特定するに至った。今回の結果から、通常検査では起因微生物が特定できない場合でも、網羅的病原体ゲノム解析により病原体を特定できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

感染症診療において適切な検査による原因微生物の特定は、治療薬を選択する上でも必要不可欠である。重症度が高いあるいは治療薬に反応しない、または長期間の治療を要する感染症において、原因微生物の同定は特に重要である。しかし感染症診療において、従来の検査法では感染症の原因微生物を特定することができない症例に遭遇することがある。このような場合、病原体に由来する遺伝子を検出することで起因微生物を推定することが可能な場合がある。

従来法で診断できない起因微生物を推定することは、感染症患者にもたらす治療上の有益性はきわめて大きいと考えられる。

2014年2月に、東邦大学医療センター大森病院で臨床像から感染性心内膜炎(IE)が強く疑われるにもかかわらず、起因病原体の特定に至らない患者に対して弁置換術が施行された。その際切除された組織(疣贅、および無冠尖、右冠尖、左冠尖)を対象に、感染症の起因病原体を特定することを目的に次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索を行なった。

B. 研究方法

臨床像から感染性心内膜炎が疑われるが起病原因の特定に至らなかった患者の弁置換術で切除された組織（疣贅：S25、および無冠尖：S26、右冠尖：S27、左冠尖：S28）より、核酸を抽出し、Nextera XT DNA Sample Prep kit (illumina) を用いて DNA ライブラリを作成した。DNA ライブラリのシーケンスは次世代シーケンサー (MiSeq, illumina) で行った。解析では、得られたデータのなかでクオリティの低いリードや塩基を除去し、さらにヒトゲノムに由来する配列を削除した。次に、残った配列を megablast で公知の病原体配列データベースと照合した。megablast で得られた結果を MEGAN (チュービンゲン大学) で閲覧した。検出された病原体分類上の属や種、そしてその配列数から IE の原因微生物を推測した。

16S rRNA をコードする遺伝子領域を PCR 法で増幅し、直接得られた増幅産物の塩基配列を決定することからも、併せて検体組織中に存在する病原体の特定を試みた。

倫理面への配慮

「微生物の網羅的検出法を用いた原因病原体の検索」は、東邦大学医学部倫理委員会から平成 25 年 12 月 19 日付で承認を受けている（課題番号：2510924060）。

本検査でも申請書に記載した通り、次世代シーケンサーで得られた配列からヒトゲノム情報を解析開始前の時点で削除した。具体的には、ヒトゲノム配列 (hs_ref_GRCh37) を対象にして Bwa mapping によりヒト配列に該当する解読リードを削除した。残る解読リードを病原体候補として megablast - nt および blastx- nr 相同性検索を行い、臨床所見に該当する病原体候補を抽出した。以上の結果、解析対象とした限定された配列情報のみから個人を特定することや、生活習慣病などの個人特有のリスク因子を特定することはできない。

C. 研究結果

各リードの megablast でトップヒットした細菌グループを集計した。検体 S25 では、ヒト配列を除去後のリード数 (136,683 本) のうち、Bacteria にヒットしたリードの割合が 4.87% (6652) であった。データベースに存在する配列にヒットしない配列は 84.8% (115,952 本) であった。Bacteria のリードのうち、Firmicutes にヒットした配列の割合が 94.0% (6250 本) であり (図 1)、そのうちリード数の割合として優勢な菌種は *Streptococcus pneumoniae* 16.2% (1001 本)、*Abiotrophia defectiva* 11.5% (710 本) の 2 つであった (図 2)。他の 3 検体でも同様の結果であった。

また、並行して実施した 16S rRNA をコードする DNA 塩基配列の解析からも全ての検体から *A. defectiva* の 16S rRNA と最も相同性の高い塩基配列が見出された。

図1. Bacteriaにおけるリードの内訳

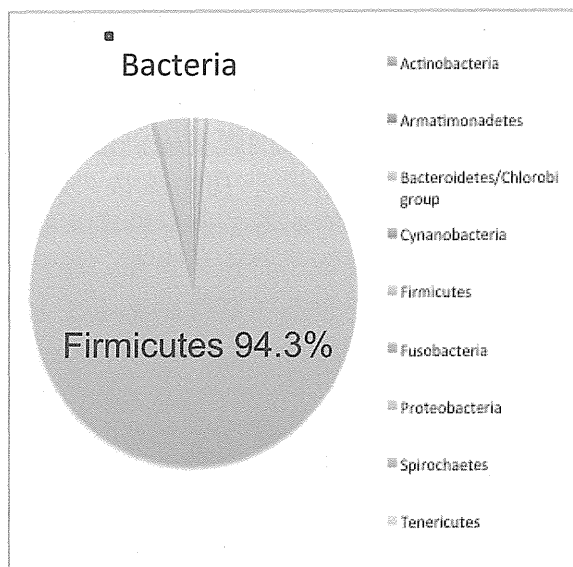
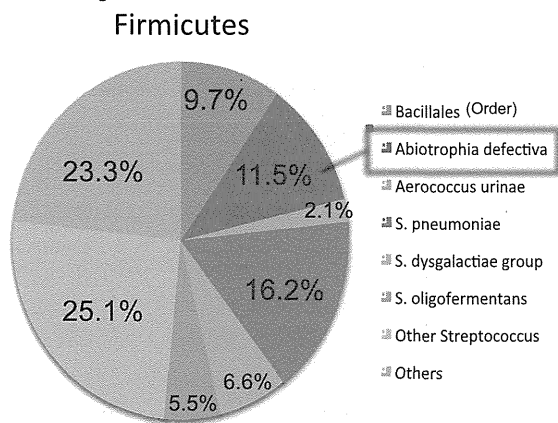


図2. Firmicutesにおけるリードの内訳



D. 考察

一般に、IEの起因病原体は血液培養から、もしくは疣贅等の感染部位の培養から検出される。しかし、本症例では血液培養から細菌が培養されなかった。さらに、培養法では弁置換術の際に切除された組織（S25～28）からも細菌は培養されなかった。

本研究では、次世代シーケンサーにより得られたデータを解析することにより、細菌のなかでも *S. pneumoniae* および *A. defectiva* のリードが優勢であった。IEの原因菌として *S. pneumoniae* は考えにくく、過去に *A. defectiva* によるIEや血流感染の報告が見られたため、本菌種が原因菌として有力であると考えられた。

また、16S rRNAをコードするDNA塩基配列を解析したところ、いずれの検体から *A. defectiva* の16S rRNAと最も相同性の高い配列が確認された。この2つの解析結果を総合して、今回のIE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えた。

次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析は、起因微生物が予測できない場合や、本症例のように培養陰性である場合にその力を発揮する。また、本手法は定量性もあるため、患者もしくは対象検査材料内における微生物量を判断できる。

本研究では、原因微生物が培養不可であった感染症の、次世代シーケンサーを用いた病原体ゲノムの網羅的解析が、病原微生物

物の同定と臨床診断の一助となることを示した。

E. 結論

原因菌が不明であったIE症例の疣贅および弁検体を用いて次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNA解析を実施した。その結果、本IE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし