

201420037A

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  
(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)

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26年度  
総括・分担研究報告書

平成27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  
(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)

1. 平成26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26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・・・・・・・・・・ 9

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

丹羽祥一 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)

筒井理華 (青森県環境保健センター)

高橋雅輝 (岩手県環境保健研究センター)

水越文徳 (栃木県保健環境センター)

安達啓一 (愛知県衛生研究所)

平野映子 (福井県衛生環境研究センター)

吉富秀亮 芦塚由紀 (福岡県保健環境研究所)

松島勇紀 (川崎市健康安全研究所)

柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所)

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)

長澤耕男 下条直樹 (千葉大学医学部小児科)

石和田稔彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

宮地裕美子 (国立病院機構横浜医療センター)

菅井和子 (国立病院機構福山医療センター)

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)

清水博之 (横浜市立大学附属市民総合医療センター)

小張真吾 (藤沢市民病院小児科)

森田幸雄 (東京家政大学)

楠英樹 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. 地方衛生研究所における次世代シーケンサーを活用した感染症検査・・ 17

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 吉住正和

(群馬県衛生環境研究所)

菅井和子 (独立行政法人国立病院機構福山医療センター)

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・・・・・・・・・・ 21

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）、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）

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

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、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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38

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・・・・・・・・・・・・・・・・ 42

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、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）、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、脇田隆字（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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

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

平成 26 年度 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  
（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））

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

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し  
的確な対処法を立案・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的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、引き続  
き感染研・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）を運用  
し、NGSを有する研究分担者（地研・大学病院）の不明症例解析をサポートした。各分担研究者  
の成績から、群馬県衛生環境研究所では急性腭（HHV-6）、脳症（HPIV-2）エンテロウイルス流行  
期（HPIV1, CoxA6）、山口環境保健センターでは呼吸器感染症で頻出する HPIV-4 の全ゲノム解  
読、富山県衛生研究所では集団食中毒下痢症（サポウイルス：2012 年名古屋・集団食中毒と同  
等の塩基配列）、東邦大学・医学部では感染性心内膜炎、脳膿瘍（Aggregatibacter, Fusobacterium  
の混合感染）、脳炎疑い（Human parechovirus 3）、感染研・感染病理部では不明心筋炎  
（trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus.）の病原体特定を遂行した。地研で収  
集した咽頭拭い液検体から、培養細胞による分離が難しい Human rhinovirus C（HRV-C）陽性検  
体を選別し、NGSによるハイスループット・ゲノム解読法を開発して計 139 株の HRV-C 表層抗原  
VP1-3 の配列情報を決定した。得られた配列情報の進化分子系統関係と表層抗原の構造シミュレ  
ーションの結果、HRV-C は 4 つの Lineage に分岐し、表層 VP1-3 は多様なアミノ酸置換を伴う抗  
原性を示しながらも免疫による Positive selection を受けていない可能性が示唆された。

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。本年度明らかになったネットワー  
クの効率が悪い律速段階に情報転送網の不備が見つかり、解読データをより迅速に転送するシス  
テム整備が不可欠であることが判明した。また、NGS 検査のみでは解決できない不明症例も散見さ  
れることから、抗体検査も視野に入れた総合的な不明症例対策も試みる予定である。臨機応変か  
つ重点的に問題解決に向けエフォートを投じ、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。今後さらに感染研と地研との連携ネットワークを発展させ、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
舘田一博	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。NGS (図1 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動向調査においても、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、NGS 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・0111・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 NGS 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カ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ーネットとして、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が照合し、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。本研究班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)。

配列解読後の情報解析に必須である Web interface による情報解析パイプラインを複数用意

した(図1)。

各分担研究者による不明症例のNGS検査成績について図2にまとめた(詳細は各分担研究者の報告書を参照)。

## 2) 各自治体検査機関の有機的な連携

本研究班の2年間を終え、各自治体主導で不明症例のNGS検査成績が出るようになり、現場単独でもNGS検査を有効に活用できることが実証された(図2)。本成績の中で特筆すべきことで、富山県衛生研究所のNGS検査結果で、不明下痢症(2013年)から検出されたサポウイルスが2012年4月の名古屋市・仕出しや弁当による集団食中毒のサポウイルスと同一であることが塩基配列の遺伝型から判明した。名古屋市の集団食中毒は、感染研・ゲノムセンターが依頼検査を受け病原体(サポウイルス)特定した事例であったため、すぐさま富山県の事例と名古屋市の事例に強い関連性を見出すことができ、双方機関へ迅速に情報伝達をすることができた。

短期的に集団発生した感染症事例であれば隣県同士で情報共有は迅速に行われるだろうが、長期的かつ散発する事例では、同一の汚染源であっても関係性を特定するエビデンスが乏しく、実地疫学情報のみでは因果関係を明確に示すことが困難であると考えられる(図3)。病原体のゲノム・遺伝型情報を有効活用すれば、長期的に発生する散発事例においてバラバラに見えていた事例が共通の事象と関連が深い可能性を指摘できるだろう。分解能の高いゲノム・遺伝型情報を応用し、実地疫学だけでは見えない情報を提供できるものと考えている。

## 3) 研究計画3年目への課題

NGS検査の感度・特異性・有効性については明らかにメリットがあるが、既存検査と比べて未だコスト高であることは間違いない(図4)。分子疫学として高分解能を有し労力も比較的少ないことから、今後の更なる技術革新(シリコン半導体によるDNAシーケンサー)が病原体検査の根本を変革し、各種検査でも陰性になった不明症例のためのNGS検査ではなく、病原体検査の1次スクリーニングとしても機能する魅力を秘めている。

ただし、NGSの更なる技術革新においても現状のネットワーク転送速度では、地研からの大量データを感染研へ迅速に情報転送ができず支障が生じている。3年目の課題として、このボトルネックを解消すべく、転送方式を2種類用意して有効な手段を探る予定である(図5)。

NGS検査による不明症例の解明において、未だ不明のまま処理される症例が後を絶たない。NGS検査でも不明のまま放置される症例への対応として、急性期IgM陽転を測定する高感度ELISA系の開発準備を行っている。主要ウイルス31種(48遺伝子)を対象に、小麦胚芽・無細胞系タンパク合成により抗原タンパク質を調整してELISA検査系を開発予定している(分担研究者: 梁明秀教授)。NGS検査との並行検査により、より精度の高い不明症例への検査体制の構築を模索する。

## 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)。

・技術研修を修了した拠点:

福岡県保健環境研究所

福井県衛生環境研究センター

東邦大学・医学部

岩手県環境保健研究センター

愛媛県立衛生環境研究所

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にて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。ゲノム情報を有効に活用した病原体検査の今後として、ゲノム情報をどのように有効活用していくのか?という課題が残っている。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、分担研究者においては不明症例の解明にNGSを活用できている。一般的に、検査現場では”効率的かつ省力化された病原体検査”の要望が強く、NGS技術はそれを可能にするひとつの手段だと考えている。この革新的な技術をさらに発展的に運用するためには、”技術指導、充実した検索データベース構築”の両方が不可欠であると考えられる。2年目の本年度は計5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を遂行した。

病原体ゲノム情報は将来的に“可用性・互換性・継続性”の高い情報源として運用が可能であり、主要各国(米国CDC/FDA, 英国PHE)と”ゲノム情報”

基盤とした病原体検索データベースの共同運用も可能になるであろう。

今後、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

- Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 5:8185
- Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H, Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 28:183-91, 2014.
- Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H\*. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.
- Doi I, Nagata N, Tsukagoshi H, Komori H, Motoya T, Watanabe M, Keta T, Kawakami M, Tsukano T, Honda M, Ishioka T, Takeda M, Ryo A, Kuroda M, Oishi K, Kimura H. An outbreak of acute respiratory infections due to human respiratory syncytial virus (HRSV) in a nursing home for the elderly in Ibaraki, Japan, 2014. *Jpn J Infect Dis.* 67(4): 326-327, 2014.

##### 2. 学会発表

- NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22nd - 23rd January, 2015. Venue: Sunshine City Conference Room No.14. The

fifth floor, World Import Mart Building, 3-1-1 Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo, JAPAN. "Pathogen Genomics for Public Health" Makoto KURODA.

- 黒田誠 次世代シーケンス技術の臨床検査応用 第26回日本臨床微生物学会総会・学術集会 東京新宿 2015.2.1
- 2014 International Hua-Xia Medicine Summit Forum on Human Genes. China. H26.4.17 -20.

#### 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



## 感染症対策・検査体制に係る次世代型病原体検索システム

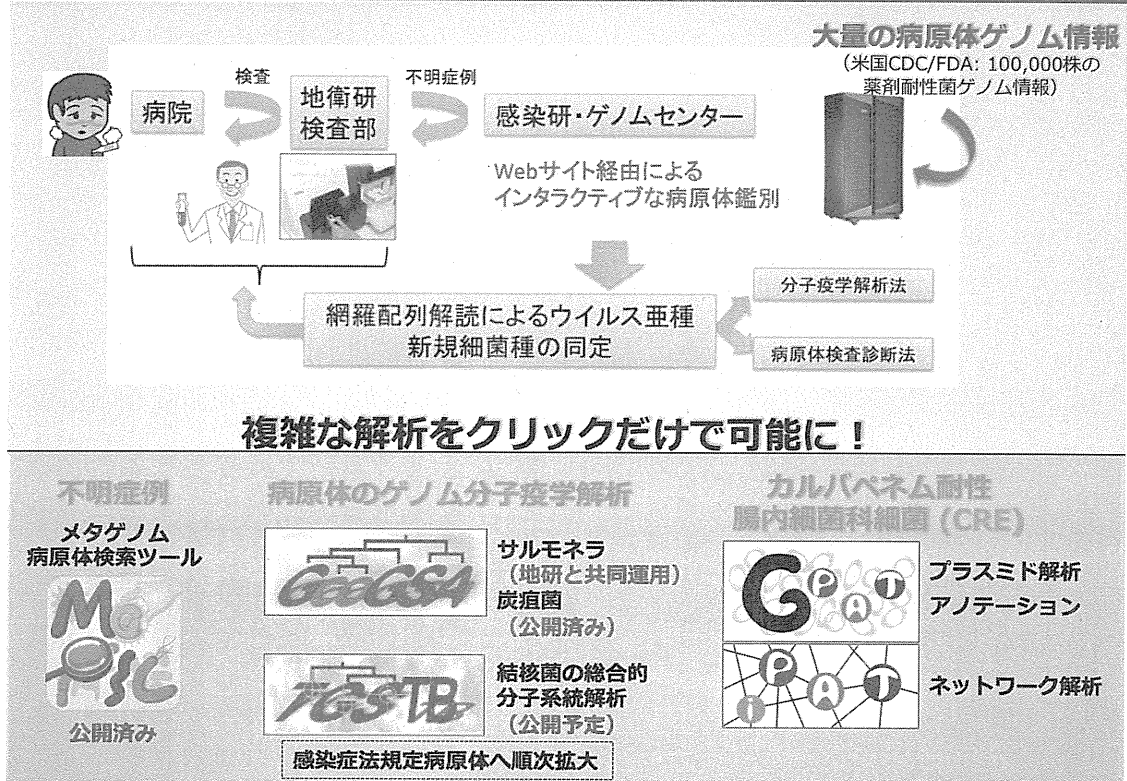


図1 ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム。地方衛生研究所等に整備された次世代シーケンサー MiSeq の迅速・効率的な運用のため、各種微生物検査の用途に合わせた Web interface による情報解析プログラムを提供中（共同研究）である。

## 分担研究者における NGS 検査の成果・活動状況

- ❖ 群馬県衛生環境研究所
  - 急性膀胱炎 ⇨ HHV-6
  - 脳症 ⇨ HPIV-2
  - エンテロウイルス流行期 ⇨ HPIV1, CoxA6
- ❖ 山口環境保健センター
  - 呼吸器感染症で頻出する HPIV4 の全ゲノム解読
- ❖ 富山県衛生研究所
  - 集団食中毒下痢症 ⇨ サポウイルス(2012年名古屋・集団食中毒と同等の塩基配列)
- ❖ 東邦大学・医学部
  - 感染性心内膜炎
  - 脳膿瘍 ⇨ *Aggregatibacter*, *Fusobacterium* の混合感染
  - 脳炎疑い ⇨ Human parechovirus 3
- ❖ 感染症・感染病理部
  - 不明心筋炎 ⇨ trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)  
Int J Clin Exp Pathol 2014. 7:5308-5312.
- ❖ 研究協力者:
  - 迅速検査キットでは陰性であった成人のロタウイルス下痢症(栃木衛研)

図2 分担研究者・研究協力者にて得られた不明症例の NGS 検査結果の概要。

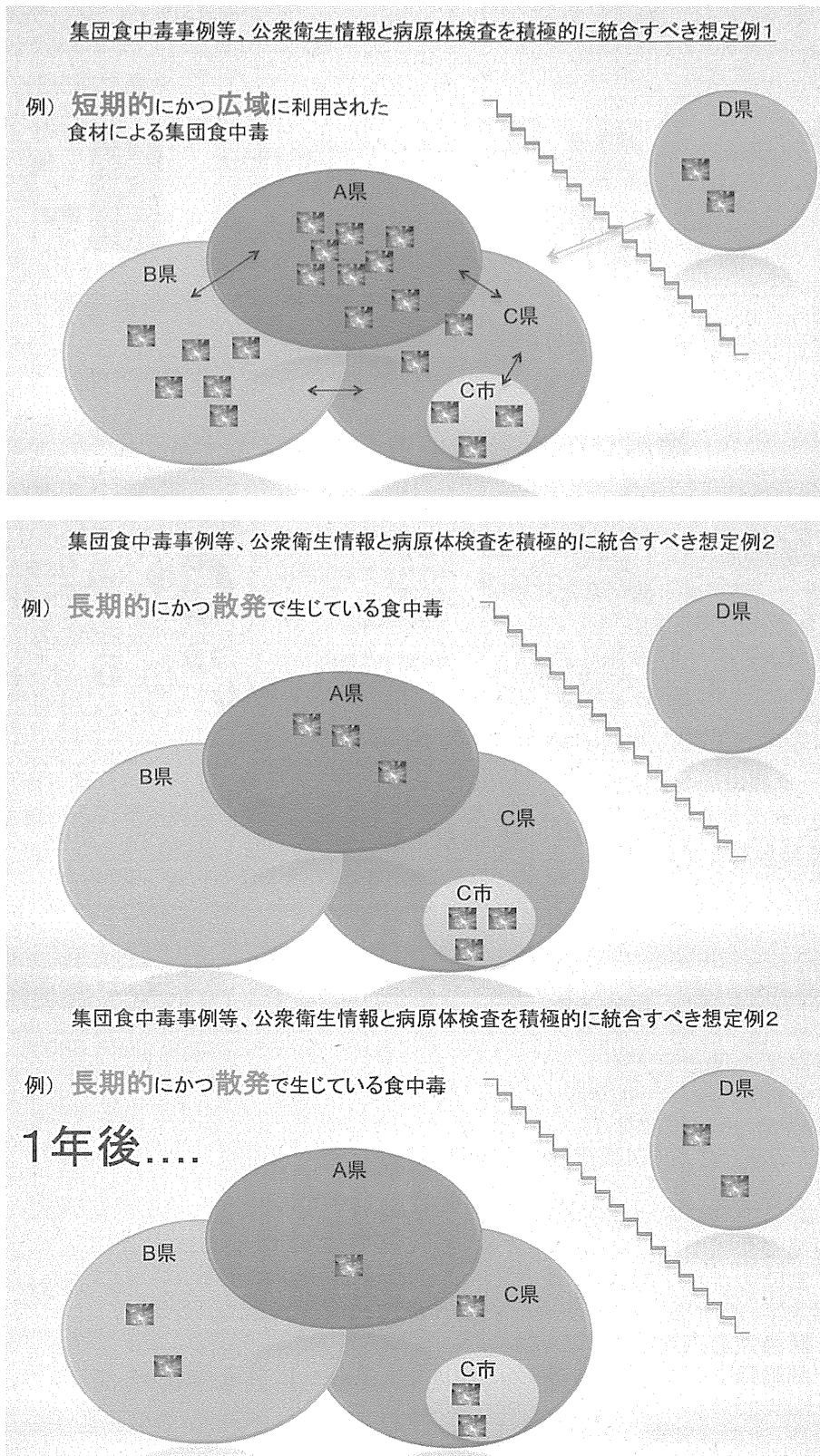


図3 病原体検査・病原体遺伝型情報の効率的な公衆衛生への還元。短期的かつ広域に発生した集団食中毒事例においては各自治体の連携は速やかに整うだろう。しかしながら、長期的に発生する散発事例においてバラバラに見えていた事例が、病原体の遺伝型情報を活用すれば共通の事象と関連が深い可能性を指摘できる。分解能の高いゲノム・遺伝型情報を適用し、実地疫学だけでは見えない共通事項を探る。

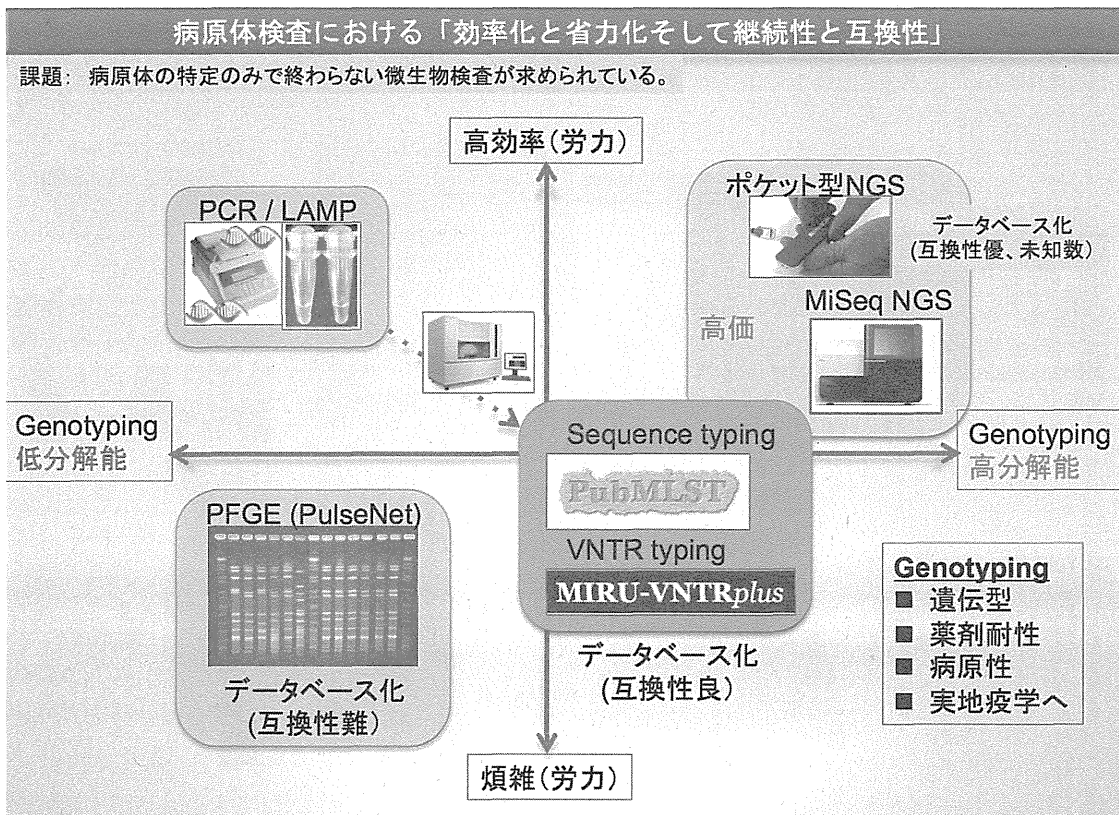


図4 病原体検査・遺伝子型別の手法ごとに分解能と労力を分布図としてプロットした。

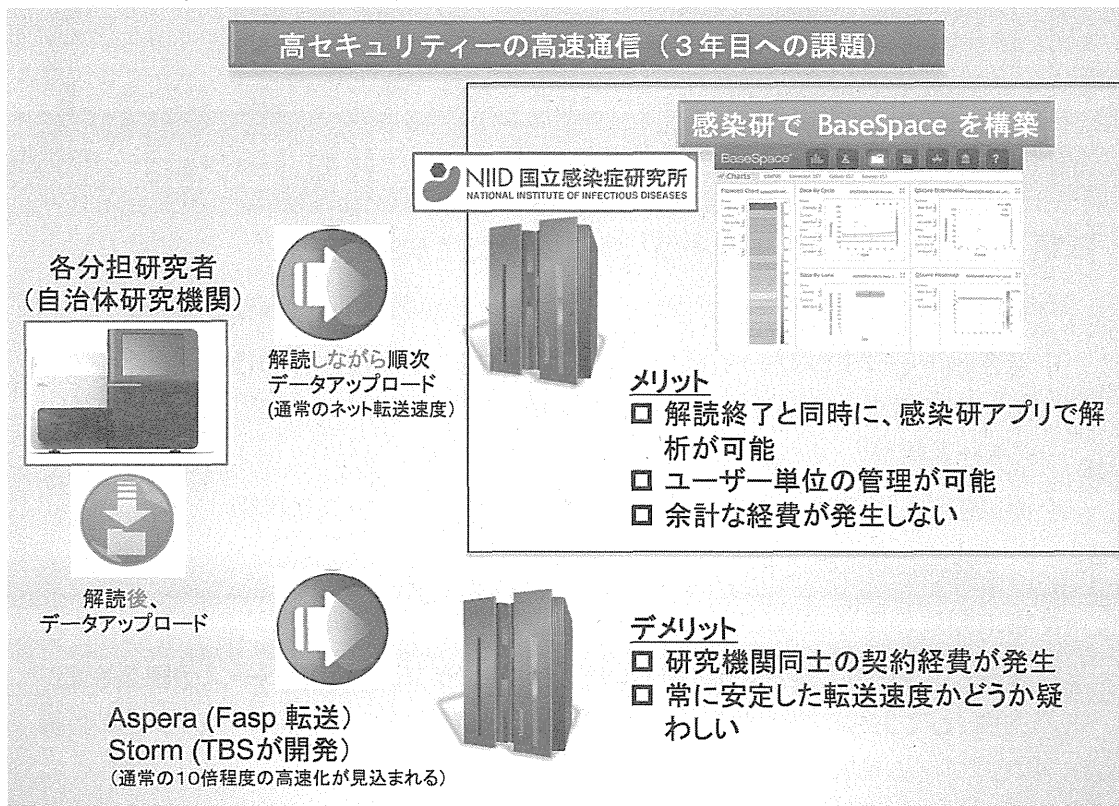


図5 本研究課題の3年目の課題。各分担研究所において NGS 検査が稼働し、感染研・ゲノムセンターでも web 解析ツールを用意出来た。しかしながら、NGS が排出する大量データのネットワーク転送に時間を要し、迅速性を活かしきれていない。そこで、2種類の転送形式を検討し解決を図る。



# プロテインアレイの作製と抗体測定の流れ

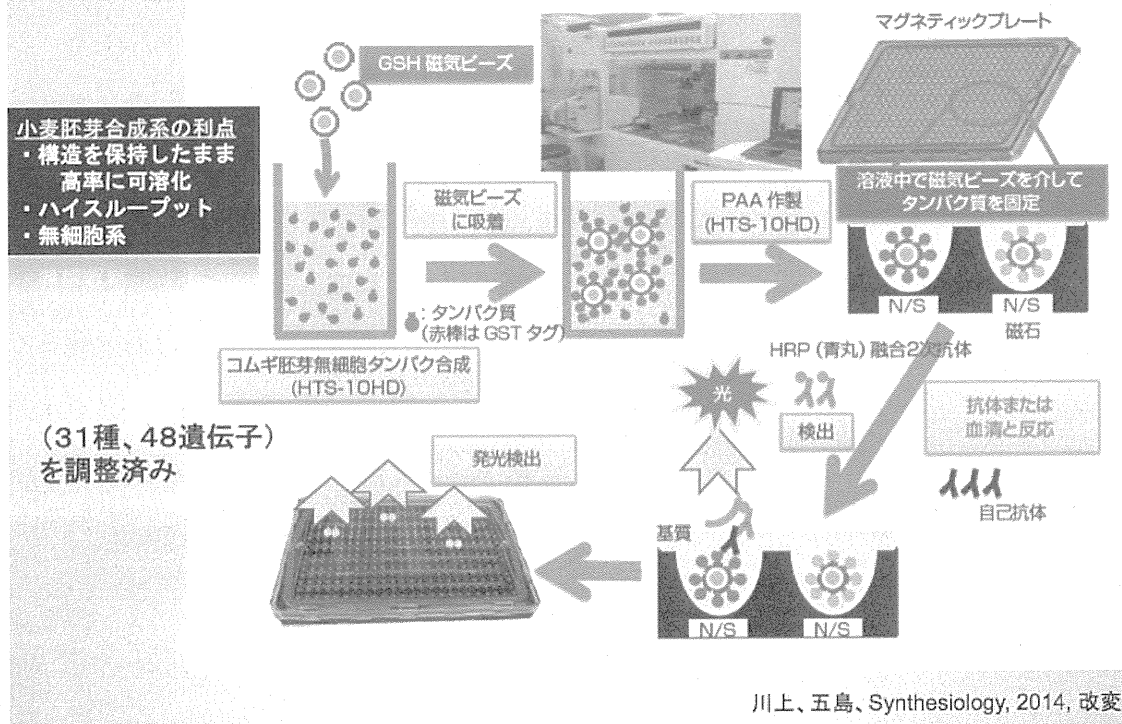


図6 NGS検査でも不明のままになる症例にたいし、急性期 IgM 陽転を測定する高感度 ELISA 系の開発準備を行っている。主要ウイルス 31 種(48 遺伝子)を抗原候補にして、小麦胚芽・無細胞系タンパク合成により抗原タンパク質を調整して ELISA 検査系を開発予定 (分担研究者: 梁明秀教授)。

## ゲノム情報を有効活用した病原体検査の今後

課題: ゲノム情報をどのように有効活用していくのか?

- ◇検査現場で “効率的でかつ省力化された病原体検査” の要望が強い。
- ◇次世代シーケンサー (NGS) はそれを可能にするひとつの技術だと考えられ、NGS検査を効率的に運用するための “技術指導”・“充実した検索データベース構築” の両方を担当する。
- ◇感染症法に規定される各種病原体のゲノムデータベースを構築 (別枠の研究班で)
- ◇将来発生しうる感染症に有効な検査システムを整備する。
- ◇米国CDC/FDA, 英国PHE においては病原体ゲノムデータベースの構築を既に遂行しており、将来的に可用性・互換性・継続性の高い情報源として主要各国と“ゲノム情報”を共同運用することが可能。
- ◇ゲノム情報を活用したリスク因子の予測は、将来発生しうるヒト適応型病原株の迅速な監視に貢献できる。

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および解析法の開発  
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

丹羽祥一 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）

筒井理華（青森県環境保健センター）

高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）

水越文徳（栃木県保健環境センター）

安達啓一（愛知県衛生研究所）

平野映子（福井県衛生環境研究センター）

吉富秀亮 芦塚由紀（福岡県保健環境研究所）

松島勇紀（川崎市健康安全研究所）

柴田伸一郎（名古屋市衛生研究所）

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）

長澤耕男 下条直樹（千葉大学医学部小児科）

石和田稔彦（千葉大学真菌医学研究センター）

宮地裕美子（国立病院機構横浜医療センター）

菅井和子（国立病院機構福山医療センター）

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）

清水博之（横浜市立大学附属市民総合医療センター）

小張真吾（藤沢市民病院小児科）

森田幸雄（東京家政大学）

楠英樹 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

次世代シーケンサーを応用し、本邦において検出されたヒトライノウイルス C (HRV-C) VP1~3 全長遺伝子の分子進化に関する研究を行った。時系列系統解析には Bayesian MCMC 法を用いた。株間の遺伝学的距離 ( $p$ -distance) 解析、SimPlot 解析および Positive/negative selection 解析も行った。さらに、VP1~3 蛋白の構造解析シミュレーションも行った。その結果、各々の遺伝子は独立かつ速い速度 ( $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year) で進化し、検出株は 40 以上の遺伝子に分類されるとともに起源は 400~900 年前に遡ることが推定された。また、検出株はきわめて遺伝学的に多様であるだけでなく、positive selection site は検出されなかった。さらに、抗原蛋白外側に、アミノ酸置換部位がきわめて多いことも推定された。以上のことから、HRV-C の主要抗原遺伝子 (VP gene) は数百年にわたり速い速度で進化しながら遺伝学的に多様化したことが示唆され

た。また、抗原蛋白は生体防御の圧力を受けにくい性質を有することも推定された。

## A. 研究目的

ヒトライノウイルス (human rhinovirus, HRV) は、種々の呼吸器感染症 (通常感冒、気管支炎および肺炎) の起因となるだけでなく、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。実際、Johnston らの報告によれば、喘息増悪時の80%にライノウイルスが検出されている<sup>1</sup>。

HRV は、3つの種 (HRV-A, -B および-C) に分類されている。HRV-A と-B は多数の血清型に分類されており、両者を合わせて、現在100種類以上の血清型のHRVが同定されている。一方、HRV-C は、近年、新たに発見されたウイルスで、細胞培養が困難であるため、このウイルスの検出には、HRV-A と-B と同様に遺伝子配列が比較的保存的な *VP4/VP2* 領域を標的とした RT-PCR を主体とした検出・解析法が用いられている。HRV-C はHRV-A と同様に遺伝学的にきわめて多様であることが示唆されているが不明な点が多い。くわえて、ウイルス抗原 (VP 蛋白) をコードしている *VP1-4* 遺伝子 (viral protein gene) の進化に関する不明な点が多い。しかし、株間の遺伝学的多様性のため、通常の primer walking 法での主要抗原の遺伝学的解析は極めて困難であることが予想される。そこで、我々は、既報のHRV-C塩基配列を網羅的に解析し、新たなプライマーセットを設計するとともに、*VP1-3* 遺伝子全長を含む約5.8kbのHRV-CのPCR産物を次世代シーケンサーにより網羅解析を行い、HRV-C臨床株139株の*VP1-3* 遺伝子の詳細な分子進化に関する解析を行ったので以下に報告する。

## B. 研究方法

検体は、2007年11月から2013年3月の間に、栃木県、福井県、熊本県における感染症発生動向調査および横浜医療センターにおいて採取した急性呼吸器感染症 (ARI)患者2922名の鼻咽頭ぬぐい液を使用した。

RNAは、QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いて抽出し、プライマーをHRV-C\_546F: 5'-

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3' と HRV-C\_6410R: 5'-CCRTCARTTTDGTTRTARTCAAA-3' 使用して PrimeScript<sup>®</sup> II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (TaKaRa Bio)にて遺伝子増幅を行った。得られたDNAをNextera XT DNA sample prep kit (Illumina)でライブラリーを作成しMiSeq (Illumina)により解読を行った。得られた塩基配列は、CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)によりアライメントし、Kakusan 4 program version 4.0 (<http://www.fif-thdimension.jp/products/kakusan/>)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 1.8.0を使用して行った<sup>2</sup>。さらに、Datamonkey [<http://www.datamonkey.org/>]において、positively/negatively selected sitesの解析をsingle likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL), およびinternal fixed effects likelihood (IFEL)の3つの方法で行い、MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>)を使用してpairwise-distance (*p*-distance)を計算した<sup>3</sup>。

HRV-CのVP1, VP2, VP3タンパク質の3次元構造モデルは、Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group Inc.)の'MOE-Align' と'MOE-Homology'を使用してホモロジーモデリングにより作成し、アミノ酸の多様性はshannon entropy scoresを使用して解析した<sup>4,5</sup>。

## C. 結果

RT-PCR法により187の増幅産物が得られ、NGSによる解析を行ったところ、139産物で完全長の*VP1*、*VP2*および*VP3*遺伝子完全長領域を含む解析可能な塩基配列が得られた。

まず、MCMC法により*VP1*遺伝子(804-846nt)を解析したところ、解析株は3系統に分類された(図1)。さらに13%のdivergenceを基準としてgenotypingしたところ44種類の遺伝子型に分類できた(図1)。各系統の共通の祖先は、1652年



(95% highest posterior density (HPD); 1522 年から 1769 年)に分岐した(図 1)。VP1 の進化速度は、 $3.48 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.36 \times 10^{-3}$  から  $4.60 \times 10^{-3}$ )であった。

次に、VP2 遺伝子(783–816nt)は、MCMC 法により作成した系統樹で 4 系統に分類された(図 2)。さらに VP1 遺伝子と同様に 13%の divergence を基準として genotyping したところ 43 種類の遺伝子型に分類できた。各系統の共通の祖先は、1294 年 (95% highest posterior density (HPD); 853 年から 1643 年)に分岐した(図 2)。VP2 遺伝子の進化速度は、 $1.35 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.12 \times 10^{-3}$  から  $6.46 \times 10^{-4}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子と同様に VP2 遺伝子にも幅広い多様性があることが分かった。

VP3 遺伝子(699–717nt)も同様に MCMC 法による時系列系統解析を行ったところ、3 系統に分類された(図 3)。さらに、13%の divergence を基準として genotyping したところ 42 種類の遺伝子型に分類できた(図 3)。各系統の共通の祖先は、1628 年 (95% highest posterior density (HPD); 1494 年から 1746 年)に分岐したことが推定された(図 3)。VP3 遺伝子の進化速度は、 $3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.63 \times 10^{-3}$  から  $4.91 \times 10^{-3}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子や VP2 遺伝子と同様に VP3 遺伝子も幅広い遺伝学的多様性を有することが分かった。

VP1 遺伝子の株間での塩基配列同一性(identity)は 60.2~100%であり、塩基同一性は 58.5~100%であった。さらに VP1 遺伝子における株間の塩基配列を基盤とした *p*-distance を計算したところ、全体の *p*-distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean±standard deviation, SD)であり、系統 1、2 および 3 の *p*-distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 4)。

VP2 遺伝子では株間の塩基の同一性は 60.2 から 100%であり、塩基の同一性は 58.5 から 100%であった。さらに VP1 遺伝子同様に VP2 遺伝子における株間の *p*-distance を計算したところ、全体の *p*-distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean±standard deviation, SD)であり、系統 1、2 および 3 の *p*-distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、

$0.29 \pm 0.11$  であった(図 5)。

VP3 遺伝子の株間の塩基の同一性は 60.2 から 100%であり、塩基の同一性は 58.5 から 100%であった。さらに VP3 遺伝子においても株間の *p*-distance を計算したところ、全体の *p*-distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean±standard deviation, SD)であり、系統 1、2 および 3 の *p*-distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 6)。

また、解析遺伝子の positively/negatively selected sites の解析を行ったところ、positive selection site は見られず、100 以上の negative selection site が検出された。加えて、HRV-C の VP1、VP および VP3 蛋白の 3 次元構造モデルからキャプシド内側に比べて、外側に高頻度のアミノ酸置換が生じていることが推定された(図 7)。

#### D. 考察

今回我々は、次世代シーケンス (NGS) を応用した HRV-C 臨床株 139 株の完全長 VP1-3 遺伝子の分子進化に関する研究を行った。ベイジアン MCMC 法による時系列系統解析の結果、解析株は、3 あるいは 4 系統に分類された。これらの株はさらに 40 以上の遺伝子型に細分類されることがわかった。解析株の VP1-3 遺伝子の起源は、1625、1125 および 1628 年に遡ることが示唆された。また、各々の遺伝子は、 $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と非常に速い速度で進化していることが示唆された。株間の遺伝学的距離は平均 0.3 を超えていた。また、いずれの遺伝子にも positive selection site は検出されなかった。さらに、構造解析により、キャプシド外側にアミノ酸の置換が非常に多いことも明らかになった。

今まで、HRV は、VP4/VP2 領域解析が主体に行われていた。しかし、この領域は、解析領域が短いだけでなく、主要なウイルス抗原部分ではないため、HRV-C の抗原遺伝子の全長配列を用いた総合的な進化解析を行うことが困難であった。また、HRV の VP 遺伝子は遺伝学的にきわめて多様であるため、従来法、例えば primer walking 法による全長解析は困難であることが推定される。そこで、我々は本研究において、HRV のゲノムの 5'末端に

近い VP4 遺伝子領域および 3'末端に近い 3D 遺伝子領域の保存的な部位に着目し、独自のプライマーを設計し、RT-PCR 法により、VP1-3 遺伝子全長を含む 5.8kb の PCR 産物を NGS により解析を行う方法を考案した。その結果、この方法により大半 (70%) の HRV-C の VP1-3 遺伝子の全長塩基配列解析に成功した。また、先端の遺伝子解析方法により、これらの主要抗原の進化解析に成功した。

今回の時系列系統解析により、各遺伝子は、400~900 年前にその起源を遡ることが示唆された。また、各遺伝子は独立かつ独自に進化していることも推定された。さらに、その遺伝学的多様性も各遺伝子により異なることも推定された。

一般に、ウイルスの主要抗原は、宿主側の生体防御の圧力などにより、positive selection が生じ、生存に有利な子孫が宿主集団に順化・適応していくことが示唆されている。しかし、今回の結果では、解析部位に、positive selection site が検出されなかった。このことは、HRV の VP 蛋白は宿主の生体防御の圧力を受けにくい性質を有することを示す。しかし、今後詳細なエピトープ解析も含め、さらなる解析が必要であると思われる。

次に、VP1-3 の構造シミュレーションにより、キャプシド内側に比し、外側に高頻度にアミノ酸置換が生じていることが明らかになった。このことは、主要抗原遺伝子の多様性が、抗原性の多様性に密接に関与していることが構造上も示している。今後、他の種、HRV-A と比較も含めた主要抗原構造に関する研究が必要であろう。

## E. 結論

NGS を応用した本邦の呼吸器感染症から検出された 139 株の HRV-C の主要抗原全長遺伝子 (VP1-3 遺伝子) の分子進化に関する研究を行った。その結果、HRV-C の主要抗原遺伝子は独自かつ非常に速い速度で進化していることが明らかになった。また、多種類 (40 種類以上) の遺伝子型の HRV-C が本邦の呼吸器感染症に関与していることも推定された。

## F. 参考文献

1. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 310, 1225-9, 1995.
2. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214, 2007.
3. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*. 21;2531-2533, 2005.
4. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 82;11247-62, 2008.
5. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* 84, 8085-97, 2010.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 論文発表

1. Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* in press.
2. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H,

- Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H, Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 28:183-91, 2014.
3. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget.* 5(18):8665-80, 2014.
  4. Tsujimoto S, Tsukagoshi H, Inai I, Yoshimoto Y, Daida A, Kusakawa I, Tanaka-Taya K, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Oishi K, Ryo A, Kimura H\*. Apnea, dyspnea, and wheezing in primary lower respiratory infections due to human rhinovirus in Japanese infants. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(3):1, 2014.
  5. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H\*. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.
  6. Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M, Kimura H, Sakai K, Kato H, Takeda M, Kubota T. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKK $\alpha$  and TBK1 on type I IFN production. *PLoS One.* 10;9(4):e94999. 2014.
  7. Doi I, Nagata N, Tsukagoshi H, Komori H, Motoya T, Watanabe M, Keta T, Kawakami M, Tsukano T, Honda M, Ishioka T, Takeda M, Ryo A, Kuroda M, Oishi K, Kimura H. An outbreak of acute respiratory infections due to human respiratory syncytial virus (HRSV) in a nursing home for the elderly in Ibaraki, Japan, 2014. *Jpn J Infect Dis.* 67(4): 326-327, 2014.
  8. Matsunaga S, Kawakami S, Okayama A, Tsukagoshi H, Kudoh A, Matsuo I, Matsushima Y, Shimizu H, Okabe N, Hirano H, Yamamoto N, Kimura H, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 5:208, 2014.
  9. Nidaira M, Kuba Y, Saitoh M, Taira K, Maeshiro N, Mahoe Y, Kyan H, Takara T, Okano S, Kudaka J, Yoshida H, Oishi K, Kimura H. Genetic analyses of VP3, VP1, 3Cpro, and 3Dpol coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 58(4): 227-38, 2014.
  10. Mizuta K, Tsukagoshi H, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Itagaki T, Nagano M, Noda M, Kimura H\*. Molecular evolution of hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene in human parainfluenza virus type 3 (HPiV3) isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture, Japan. *J Med Microbiol.* 63(4): 570-577, 2014.
  11. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno H, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 11(1):9, 2014.
  12. 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.
  13. 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*.  
33(5):643-52, 2014.

14. Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M,  
Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura  
H, Kojima S. Long-term parvovirus B19  
infections with genetic drift after cord blood  
transplantation complicated by persistent  
CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol  
Oncol*. 36(1):e65-8, 2014.

## 2. 学会発表

1. 小林美保他 第62回日本ウイルス学会学術集  
会(H26年11月10-12日)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

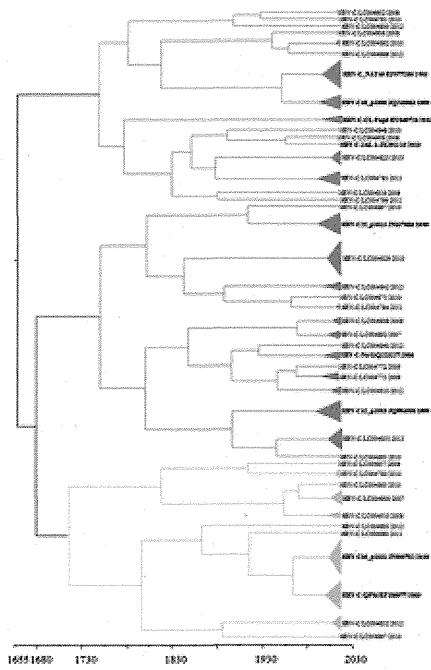


図1 VP1 遺伝子分子系統樹(MCMC 法)

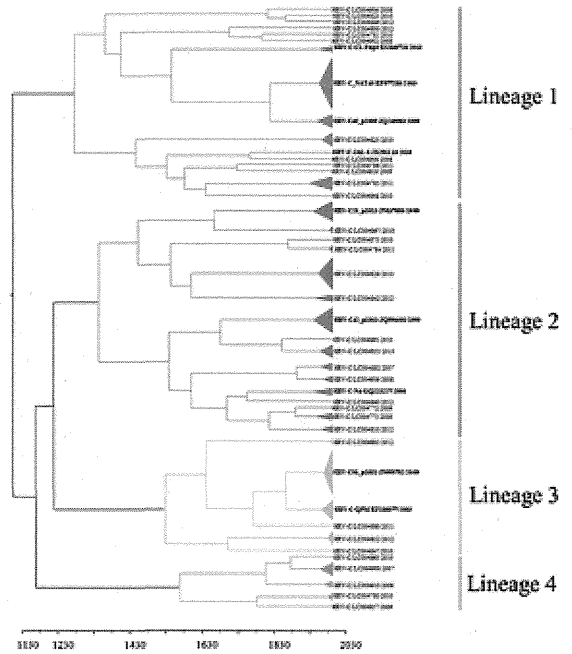


図2 VP2 遺伝子分子系統樹 (MCMC 法)

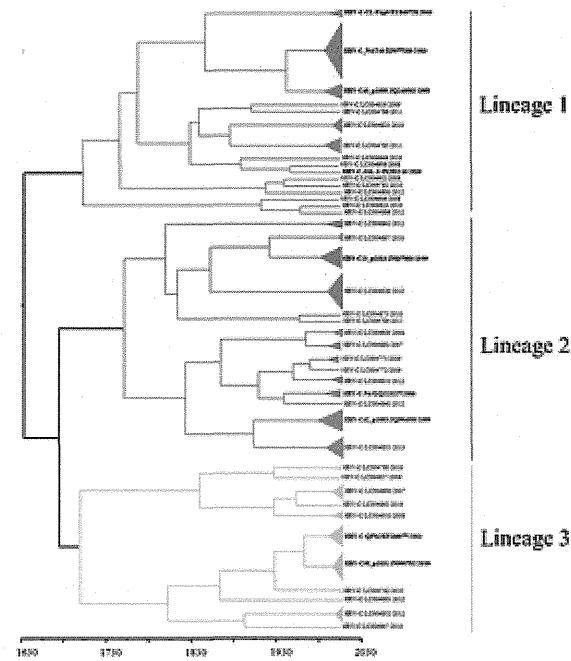


図3 VP3 遺伝子分子系統樹(MCMC 法)

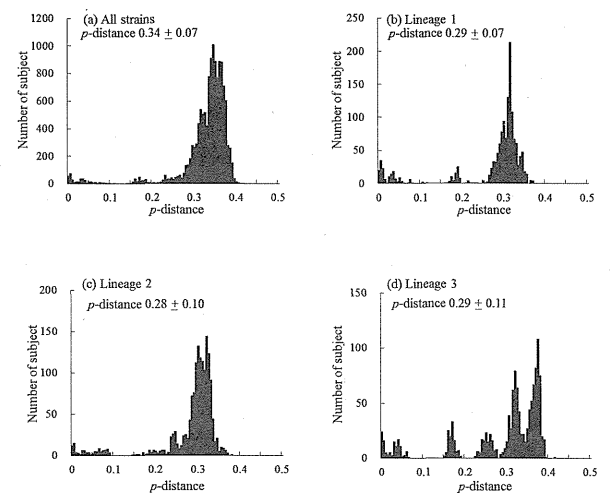


図4 VP1 遺伝子の p-distance

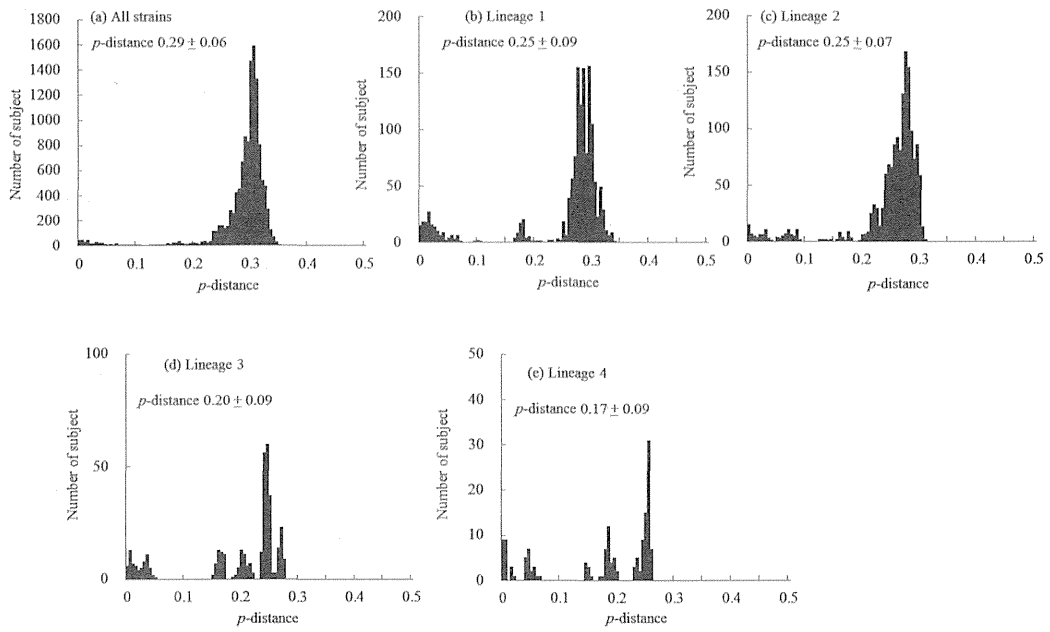


図5 VP2 遺伝子の  $p$ -distance

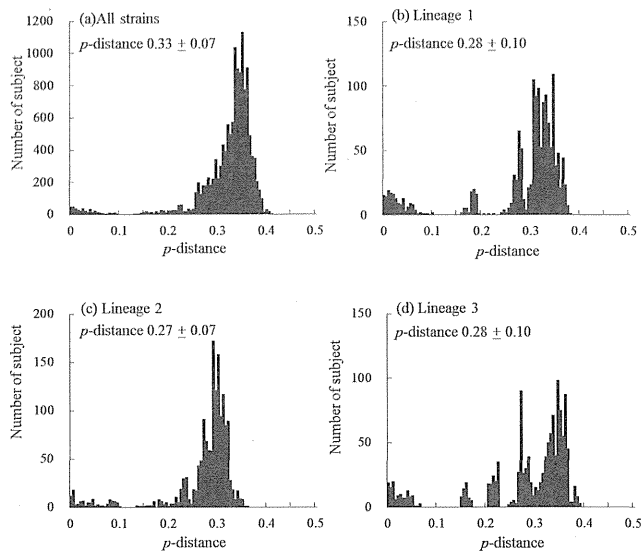


図6 VP3 遺伝子の  $p$ -distance

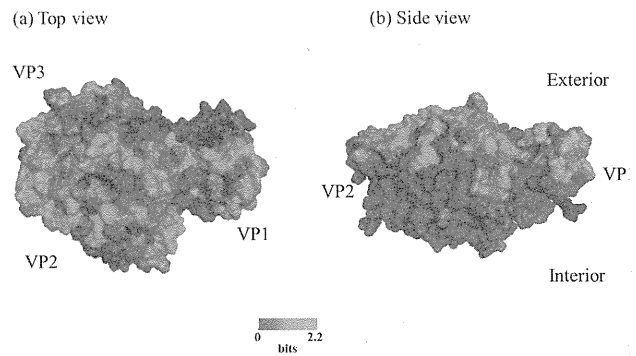


図7 VP1, VP2 および VP3 タンパク質の 3次元構造モデル

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

地方衛生研究所における次世代シーケンサーを活用した感染症検査

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 吉住正和 群馬県衛生環境研究所

菅井和子 独立行政法人国立病院機構福山医療センター

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、従来法では特定が困難なウイルスも塩基配列から検出する事ができる有力なツールである。本研究では、感染症発生動向調査などへの応用を視野に入れて流行期におけるウイルス検査および重症例など臨床の現場で原因の特定が期待される感染症の検査においてNGSを活用し、その有用性に関する検討を行った。NGSにより検出されたウイルスの遺伝子はRT-PCR法により確認を行い、さらに得られた遺伝子から分子系統樹解析を行った。その結果、エンテロウイルス流行期においてエンテロウイルスが検出されなかった咽頭ぬぐい液からヒトパラインフルエンザウイルス1型が、不明症例（脳症）として検査を行った咽頭ぬぐい液からヒトパラインフルエンザウイルス2型が検出された。これらのことから、NGSは高感度に幅広くウイルスを検出することができるため、原因の特定が困難なケースにおいて有力な検査法であることが示された。

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検査を行っている。特に、集団発生などにおいて早期に病原体を特定することは公衆衛生上とても有意義である。

近年、遺伝子検査により病原体を特定する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ウイルスや未知の病原体の検査においても有用である。そこで、本研究ではNGSを活用して、エンテロウイルス感染

症の流行期におけるNGSの活用法について検討を行うとともに、医療現場において原因となる病原体の推定が困難である症例（不明症例）におけるNGSの有用性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採取された咽頭拭い液8検体を材料とした。不明症例では急性腭炎（好酸球性増多あり）から採取された咽頭ぬぐい液、鼻汁、便、血清および脳症の患者より採取された咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液、血清の合計8検体を使用した。ウイルスRNAは、QIAamp Viral RNA Mini kit® (QIAGEN)を

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、サンガーシークエ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

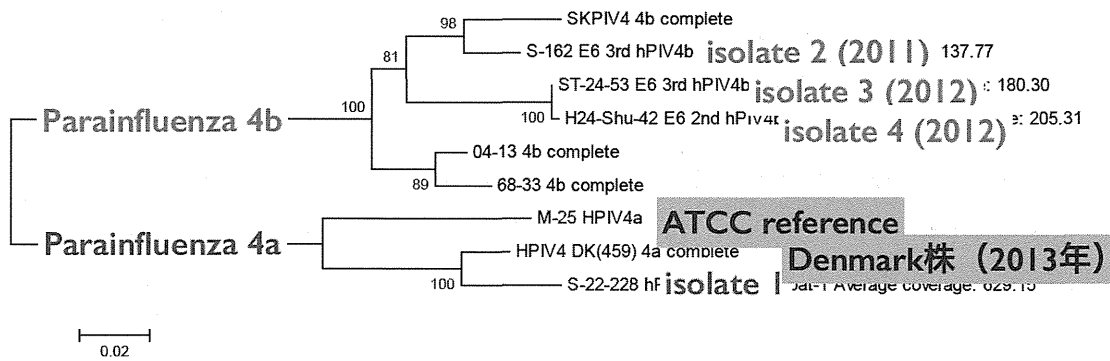


図 1. Parainfluenzavirus 分離株のゲノム配列による系統樹解析

## 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

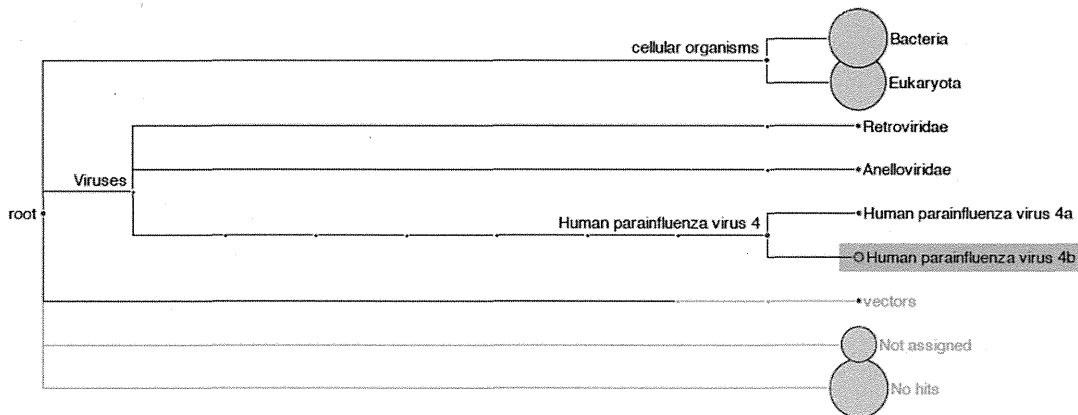


図 2. 臨床検体のゲノム解析