

平成 24 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)
分担研究報告書

「山口県における呼吸器症ウイルスサーベイランス」

研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
研究協力者	中川 (岡本) 玲子	山口県環境保健センター
	戸田 昌一	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
	濱岡 修二	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

研究要旨

山口県環境保健センターでは、本研究班の発足と共に呼吸器疾患のサーベイランスを強化し、県内 1 つの診療所、3 つの基幹医療機関、および山口大学病院から年間を通して検体を採取し原因ウイルスの検索を行ってきた。本報告書では、平成 22 年-24 年度の呼吸器疾患サーベイランスの結果をまとめ、主に以下の様な結果を報告する。

1. 2010 年にそれまで殆ど検出の報告がなかった EV 68 による急性呼吸器疾患の流行を検出した。EV68 に感染により、コントロールされていないアレルギーを基礎に持った患者が急性の重症喘息を発症することが示された。
2. パラインフルエンザについては、HPIV1, 2, 3, 4 の 4 種類を検出した。春から初夏にかけて HPIV3 が最も多く検出され、肺炎など重症化例が多かった。HPIV 4 は遅れて流行し、これまでの重症化は少ないとの報告に反して入院患者から多く検出された。
3. 喘息患者からの検出は、rhinovirus が最も多く、そのなかで rhino A と C が多く検出された。Rhino C ウイルスについては、最近報告された変異型も 2 株検出されており今後の動向に注目したい。

A. 研究目的

厚生労働省の病原体発生動向調査事業における病原体サーベイランスには、インフルエンザ、RS をのぞいてウイルス性呼吸器疾患は含まれておらず、急性呼吸器症を引き起こす病原体の流行の実態については不明な点が多い。そこで、山口県内の小児科クリニックの外来患者、3 つの基幹医療機関と山口大学病院の入院患者から検体を採取し、RT-PCR、細胞培養法によりウイルス検出を行った。山口大学からは動脈血 pO_2 が 95%以下に低下した比較的重症の呼吸不全を伴う患者から検体を採取した。

B. 研究方法

2010-2012 年に呼吸器症状を呈して、医療機関を受診した患者から採材された検体 (咽頭拭

い液等) から RNA を抽出後、HPIV の 1-3 型は *HN* 遺伝子、4 型は *P* 遺伝子、また、その他に HRV、EV は *EVP4/EVP2* 領域、RSV は *N* 遺伝子、HMPV は *F* 遺伝子、HBoV は *NP1* 領域、アデノウイルスは *hexon* 遺伝子、ヒトヘルペスウイルスはポリメラーゼ領域について RT-PCR 法または、PCR 法を行った。

また、Vero E6 細胞、HEp-2 細胞、RD 細胞、Vero 細胞を用いてウイルス分離を行った。

C. 研究結果

1. 検査検体数

検査検体数は、2009 年は 117, 2010 年は 538, 2011 年は 913, 2012 年は 556 (11 月現在) であった。

2. 検出ウイルス

最も多く検出されたのは、パラインフルエン

ザウイルスであり、ついでRSウイルス、ヒトボカウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス68、エンテロウイルスなどであった(図1)。インフルエンザウイルス、RSウイルスは迅速検査法が医療機関で使われているため検査依頼が少なかった可能性があり、この数を直ちに感染症の原因と関連させることは出来ないが、パラインフルエンザウイルス、ヒトボカウイルスが高頻度で検出されたことは注目値する。

3. ライノウイルス/Rhinovirus の検出

呼吸器疾患から検出されたウイルスは、ライノウイルスが最も多く、そのうちライノウイルスA、Cが多かった(図2)。ライノウイルスによる喘息ではCが検出率、絶対数共に高かった。ライノウイルスCのほうが検出数は少ない事から、喘息の原因となる率は高いと考えられる。

4. パラインフルエンザウイルス/HPIV の検出

HPIVの型別の検出割合をみるとHPIV3が多く、次いでHPIV4が検出された(図3)。HPIVは一年中検出されるが、HPIV3については春先から初夏にかけて多く検出された。HPIV4については、ほぼ一年中検出されるが、10月をピークに7月から12月に多く検出された(図3)。喘息の原因となる型は3型が最も多く、次いで4型であった。入院患者からの検出数も3型が最も多く次いで4型であったが、入院患者の率は3型の方が高い。これまで、4型が重症化の原因と認識されていなかったが、本研究では重症患者から検出されておりさらなる調査により確認する必要がある。

5. EV68と喘息

2010年に入院患者からEV68ウイルスが検出され、EV68ウイルスのみが検出された喘息の入院患者は26例に上った。患者の90%以上が長期の喘息のコントロールを受けていなかった。このことから、軽症の喘息患者であっても長期コ

ントロールを受ける必要性が示唆された。

D. 考察

我が国においては、厚生労働省の病原体発生動向調査事業により5類感染症のサーベイランスが行われているが、呼吸器疾患のサーベイランスはインフルエンザウイルスとRSウイルスに限られている。しかし、多くの地研で呼吸器疾患のサーベイランスは自主的に行われている。今回に研究により、EV68の流行の検出やパラインフルエンザウイルス、特に4型の呼吸器疾患への関与が明らかとなった。これらの知見は将来のワクチン開発などに有用な情報である。少なくとも主要な地研においてこのような自発的なサーベイランスが行われることが公衆衛生にとって重要であると考えられる。

E. 結論

呼吸器疾患のサーベイランスの重要性が示唆された。実施したサーベイランスにより、EV68の流行が検出され、パラインフルエンザウイルス4型の重要性が明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M. Molecular Analysis of Genome of the Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 Virus Associated with Fatal Infections in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures in Japan during the First Pandemic Wave. *Jpn J Infect Dis.* 2012 Jul; 65(4): 363-7.
2. 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 ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 2012;61, 410-9.
3. Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children *Allergy* 2011; 66(12) 1618-1620
 4. Association between the FTO gene and overweight in Japanese children and adolescents. Okuda M, Hinoda Y, Okayama N, Suehiro Y, Shirabe K, Sasaki S, Kunitsugu I, Yoshitake N, Hobara T. *Pediatr Diabetes.* 2011;12(5):494-500.
 5. Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine.* 2011 ;54(2):167-72.
 6. Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 ;22, 119-23.
 7. Okuda M, Sugiyama S, Kunitsugu I, Hinoda Y, Okuda Y, Shirabe K, Yoshitake N, Hobara T. Use of body mass index and percentage overweight cutoffs to screen Japanese children and adolescents for obesity-related risk factors. *J Epidemiol.* 2010;20(1):46-53.
1. 学会発表
なし
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

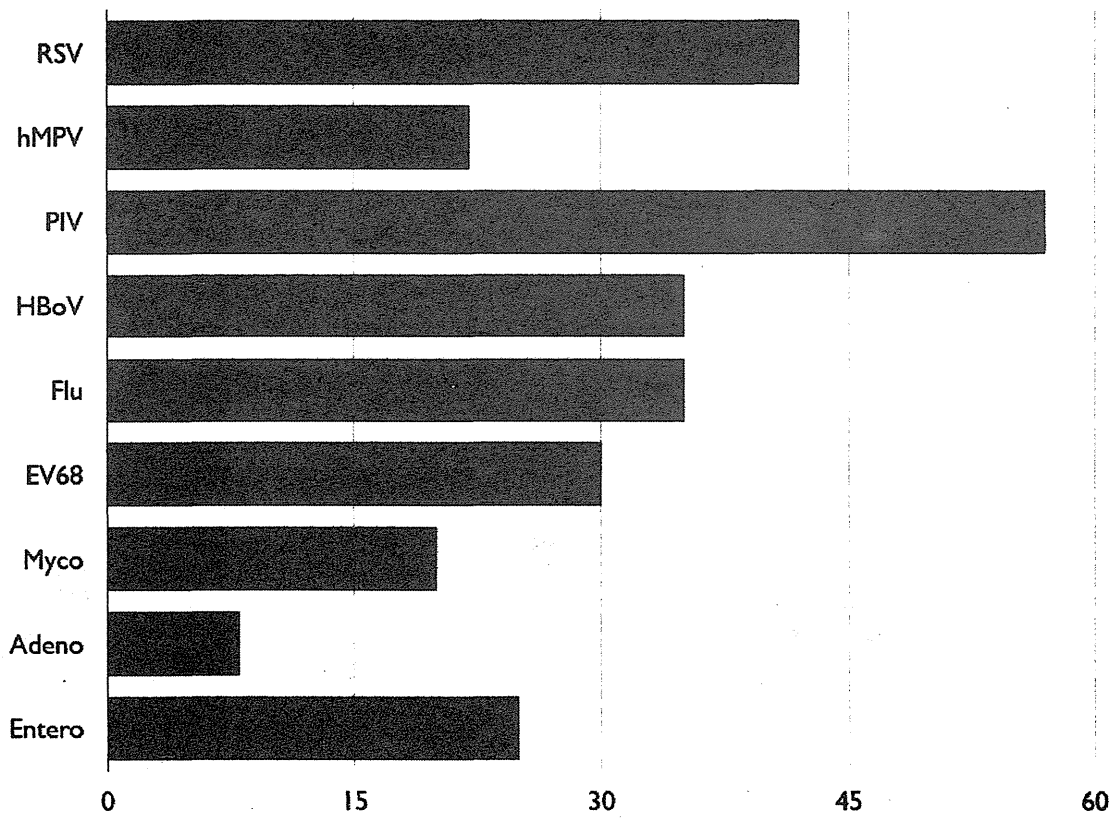


図1 2010年から2012年までに検出されたウイルス

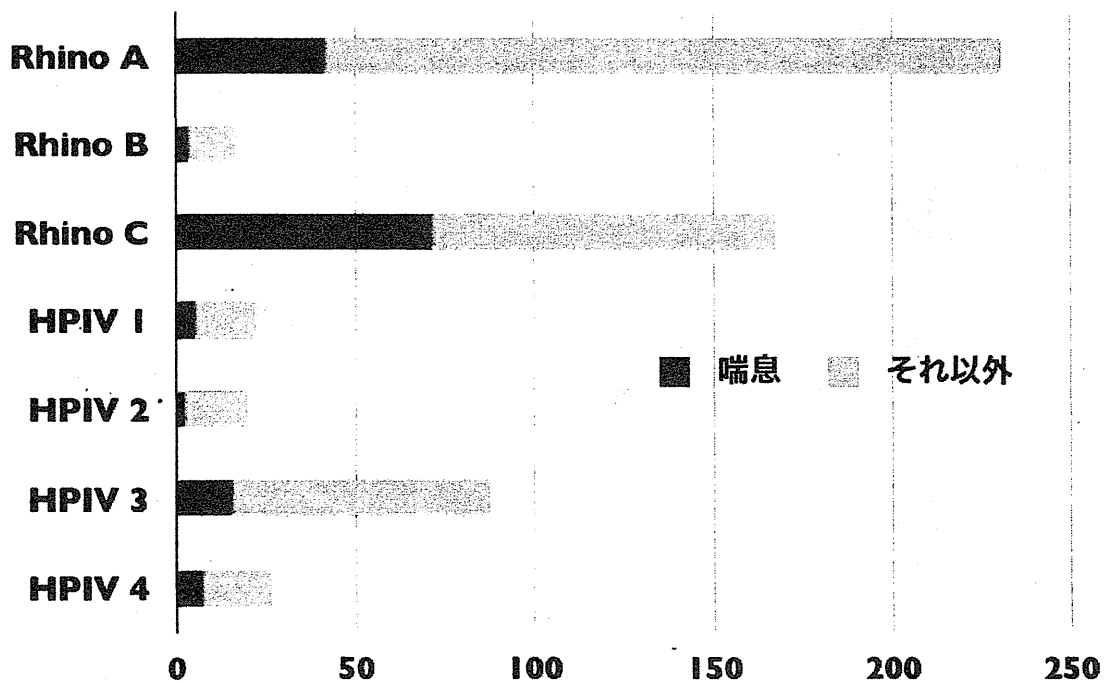


図2 呼吸器疾患から検出されたライノウイルスとパラインフルエンザウイルス

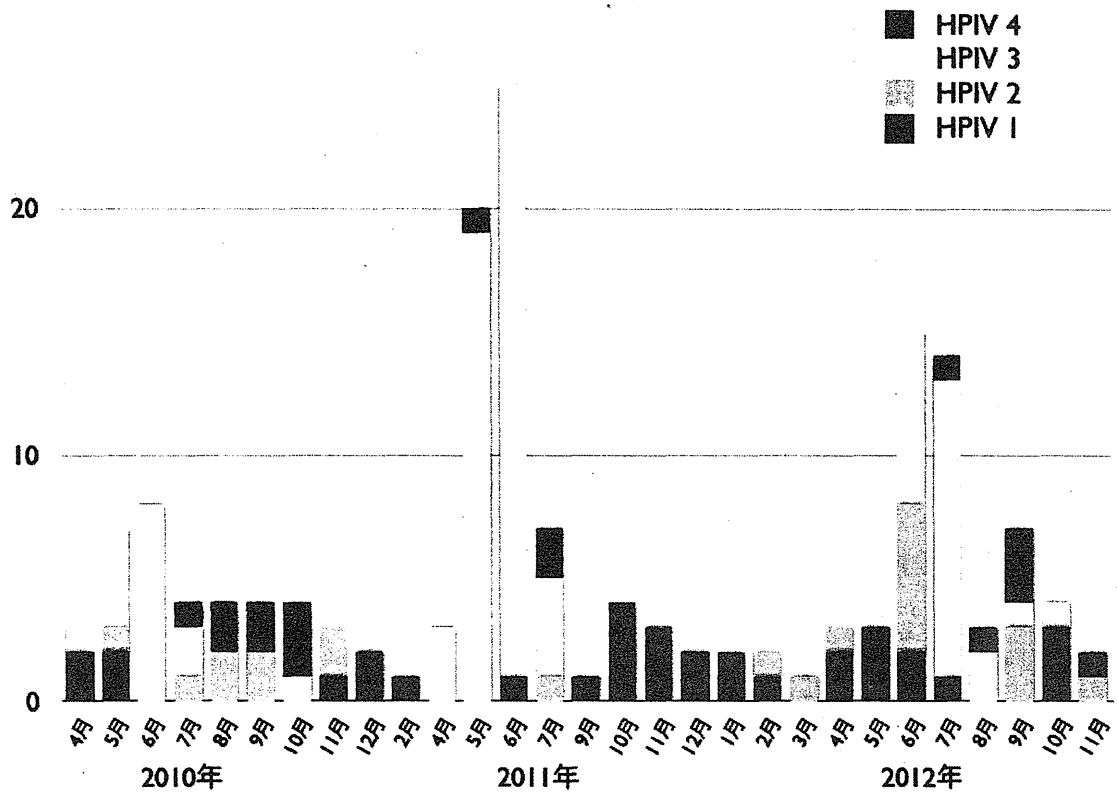


図3 パラインフルエンザウイルスの季節性

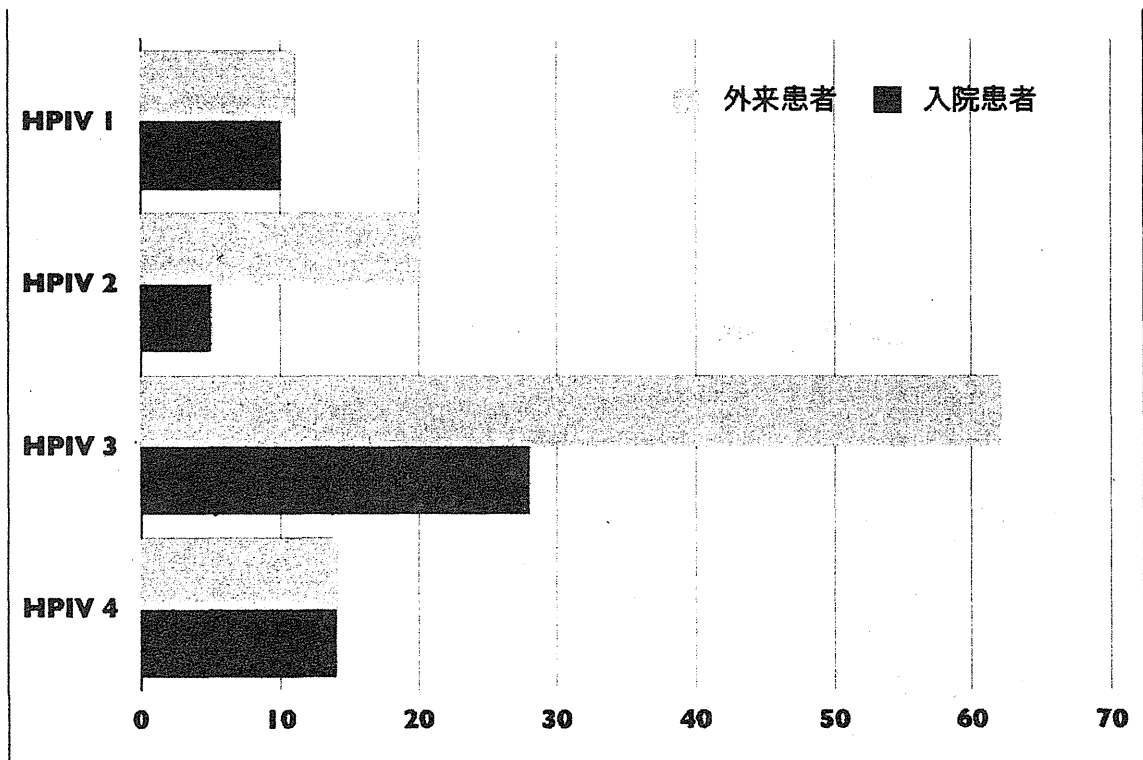


図4 外来患者、入院患者からのHPIV検出数

平成24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）
分担研究報告書

呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究

研究分担者	黒田 誠	所属	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	水田克巳	所属	山形県衛生研究所
	野田雅博		国立感染症研究所・感染症情報センター
	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

研究要旨

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの引き起こす重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。本研究は、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログ作製を目的としている。網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、臨床検体の入手ができれば直ぐにでも国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで実施可能となっている。しかしながら、迅速な対応と先端的な感染症対策技術の普及のためには、感染研で構築したシステムを現場でも利用できるような体制と支援が必要である。本年度は次世代シーケンサーによる解読リードを病院・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を構築した。情報解析の経験が浅く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。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスは、かぜ様症候群を引き起こすだけでなく、気管支炎や肺炎などの重症呼吸器感染症を引き起こすことがよく知られている。本邦における、重症呼吸器感染症(肺炎)による年間死亡者数は推定で10万人を超えており、新興ウイルス(A(H1N1)pdm や SARS ウイルス)の出現を考慮すると、重症呼吸器ウイルス感染症の対策はますます重要になっている。多くの呼吸器ウイルスの解明が進展している一方、臨床的に重症化した呼吸器ウイルス感染が疑われる症例の半数以上において病原ウイルスが検出されていない。既知ウイルス配列情報のみでは対応できず、不明病態（脳炎、下痢、サイトカインストーム）において病原体の包括的な検索が不可欠になっている。本研究では、次世代シーケンサーの解析能力を駆使し、重症呼吸器ウイルス感染症患者から供試頂いた検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を網羅的に解読し、

検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログを作製する。

B. 研究方法

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した網羅的病原体検査法の情報解析のみをパイプライン化し、インタラクティブに誰でも利用できるソフトを開発した。詳細は研究結果-3,4を参照。

（倫理面への配慮）

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

1) ベンチトップ型次世代シーケンサーの特徴

従来の次世代シーケンサーは大型シーケンサーという特徴から、大量配列の排出には有効である。しかしながら、集団不明症例等、有事に迅速に対応するためには解読時間の短縮が求められていた。大型シーケンサーよりも安価でかつ解読時間を短縮したベンチトップ型・次世代シーケンサーの登場により、従来よりも迅速に臨床検体の病原体検索が可能となった。昨年度に報告した野党病菌感染症例を挙げると、大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった(図1)。大型と比較して解読量は減るものの、臨床検体から病原体推定する場合には十分な量を得られることが分かった。

2) ネットワーク経由による不明症例のための網羅的病原体検査システム(案)

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、感染研に検体が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感染症対策に資するものと考えている(図2)。

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を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。

3) 臨床検体からのDNA・RNA精製

- 配列解読の始発材料はDNAもしくはRNAであり、純度の高いサンプル調整が必要である。
- 臨床検体の採取部位と推定病原体に合わせた調整法も要求される。
- 全血、血清、血漿、髄液、鼻咽頭拭い液、下痢便、膿など、臨床検体に合わせた核酸調整キットを活用する。
- 該当病原体が高度変異RNAウイルスであることを想定して、DNAのみならずRNAも同時に調整する。
- グラム陽性菌、真菌による感染症が疑わしい場合、検出感度を上げるためには溶菌処理が必要になる。溶菌酵素(Achromopeptidase, Lysozyme, Mutanolysin等)やビーズシェーカーによる物理的破砕が効果的
- 網羅的に配列解読を行うため、様々な工程におけるコンタミネーションが生じうる。また、ヒト常在微生物等によるバックグラウンドを予め理解しておく事が望ましく、可能な限り正常組織からも同様の核酸調整を行い、配列解読に用いる。
- Earth Microbiome Project からメタゲノム解析用のDNA調整法が提案されている¹。環境微生物対象であるが、臨床検体でも同様の操作で調整可能である。

4) 解読ライブラリーの作成法

4-1) DNAライブラリーの作成法

網羅的なDNAライブラリーを作成するために、適切な塩基長のDNAに剪断して、解読システムに準じた特異アダプター配列をDNA両末端に付加する方法が一般的である。ただし、剪断法によってライブラリー作成の効率が大きく異なり、ゆえにDNAの最小必要量にも影響を与えてしまう。基本、下記の2通りが主に利

用されている。各種微生物検査を終えた後、残る少量の臨床検体からスクリーニングを余儀なくされることもあるだろう。貴重な検体をできる限り残し確保することが望ましく、少量で解読できる作成法を選びたい（図3）。

・物理的切断によるランダム DNA ライブラリーの作成法

窒素ガス吹付けもしくは超音波破碎機（Covaris 社製）により物理的に DNA を切断し、末端を平滑修復後、両末端に特異アダプター配列を連結。≥1 μg の DNA を必要とする。

・Tn5 トランスポザゼによる DNA タグメンテーション法によるランダム DNA ライブラリー作製法

Tn5 トランスポザゼによる DNA タグメンテーションで切断し、同時に特異配列を対象 DNA に挿入する。トランスポザゼによる酵素学的な挿入であるため配列特異性などのバラツキが懸念されるが、様々な生物種のゲノム解読から非特異的な挿入傾向（つまり均等な挿入）を示すことが知られている。挿入された特異配列を利用した Bridge-PCR にて、両末端に特異アダプター配列を連結させる。最小量として 1 ng の DNA 量で充分である。

4-2) RNA を元にした DNA ライブラリー作成

RNA ウイルスを対象とした病原体検索の場合には RNA を試料としたライブラリー作成が必要である。RNA をダイレクトに解読できないため、ds-cDNA に合成する必要がある。方法は 2 通りあって、それぞれの特徴を上げる。

・二本鎖 cDNA(ds-cDNA)の合成による DNA ライブラリーのサンプル前調整

RNA から逆転写酵素等を利用した ds-cDNA を合成する。そして、上述の DNA ライブラリー作成法を行う。予め ds-cDNA に合成してしまうため、RNA ウイルスのストランド特異性が不明瞭になってしまう。また、ds-cDNA を合成す

る効率に依存するため、相当量の始発 RNA が要求される。

・ランダムプライミング法による DNA ライブラリー作成法（図3）

ランダムヘキサマーと逆転写酵素を用いたランダム・プライミング法により RNA からダイレクトにライブラリーを作成する。ランダムプライマーの 5'末端には解読システムの特異アダプター配列（2種類）が付与されているため、増幅過程において両末端に特異アダプター配列が付与される。1st ステップの逆転写反応の際、ストランド特異性が判別できるような特異オリゴ配列になっている。例えば、5'-NNNNNN-1st-特異 adapter-seq -3' を 1st 逆転写反応に使用し、相補鎖である 2 本鎖目を合成するときには、5'-NNNNNN-2nd-特異 adapter-seq -3' を使用することでストランド特異性を持ったライブラリー作成が可能である。トランスクリプトーム解析では mRNA のストランド特異性を判別できることが重要であり、慎重にライブラリー作成法を選別したい。

5) 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)の解読リードをリアルタイムにネットワーク転送することが可能になっており、随時、スマートフォン等を利用して解読状況の確認と情報解析を行うためのクラウドサービス Illumina BaseSpace が提供されている（図4）。残念ながら、この BaseSpace には病原体を推定する解析プログラムは用意されていない。本研究課題のテーマの一つである“誰でも利用しやすい環境”が重要だと考えている。そこで、次世代シーケンサーによる解読リードを病院・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を構築した（図5）。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利便性を考えて作成した。

6) インタラクティブな情報解析パイプライン
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ステムレスに行うことができる。

- 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 (図 6)
- 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 (図 6)
- 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) (図 7)
- 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 (図 8)

得られた 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 (図 8)。そのテキスト配列をフリーソフト MEGAN (MEtaGenome ANalyzer) で生物種毎の系統分類をおこなった。

<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>

MEGAN の使用方法についての詳細は割愛する。

サンプル検体として、咽頭拭い液から細胞培養により増殖させた分離ウイルス (細胞 CPE 上清) と、オリジナルの咽頭拭い液の DNAseq, RNAseq の結果を用いた。RNAseq の結果から、Saffold virus を検出した。検出感度は総解読リード数の 0.4~4% であり、8kb の Saffold virus 全長を確定することが可能であった (図 9)。

D/E. 考 察・結 論

これまで分担研究として、重症呼吸器感染症にかかる不明症例の病原体検索を行なってきた。次世代シーケンサーによる網羅的配列解読は有用であるが、感染研でのみ解析できるシステムになっていては、臨床検体の送付・授受等にかかる時間・手続き等による遅延が生じてしまう。何よりも緊急事態に直面している現場で活用できるシステムであって欲しいと常に願っている。そのために必要な支援はどこにあるのか考慮した結果、情報解析を簡便に行えるツールの重要性を感じている。

本年度の課題として、情報解析の工程に特化して迅速性を追求したシステム改善を行った。今後、様々な工程の中でボトルネックになっている箇所を効率よく改善し、総合的なシステムを構築したいと考えている。未だ解消されていないボトルネックが残っていることは事実だが、誰もが簡便に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が後々追いつき、結果、汎用性の高い“網羅的病原体検索”として貢献できると考えている。各自治体で集団感染事例や不明症例についても積極的な検査・鑑別を執り行っていただくための一助として、本システムの重要な情報解析パイプラインを早急に完成させるつもりである。

F. 健康危険情報

特になし

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

(予定を含む。)

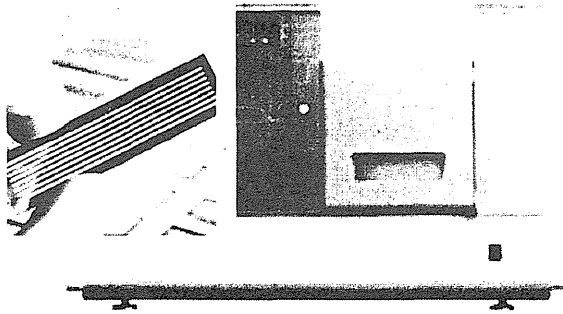
1. 特許取得

なし。

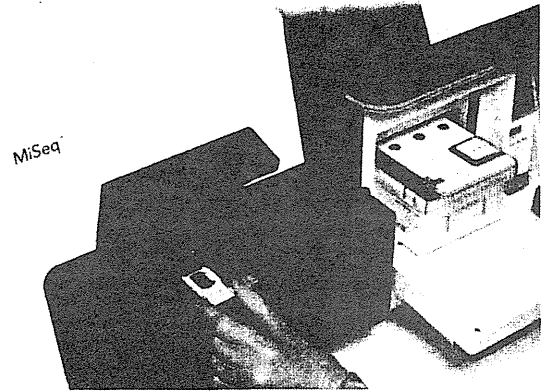
2. 実用新案登録

なし。

3. その他

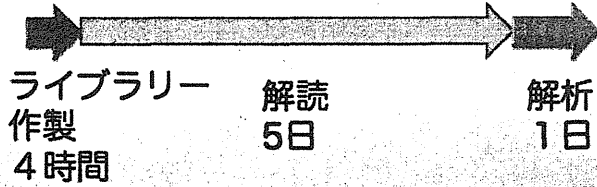


- 8レーン
- 解読時間： 1～2週間



- 解読面積・量が1/50
- 解読時間： 1～2日

野兎病菌・膿瘍の場合 7日間



MiSeq の導入により 2.5日間

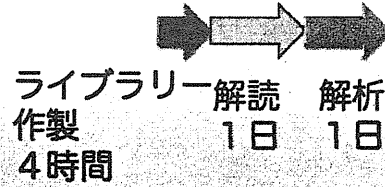
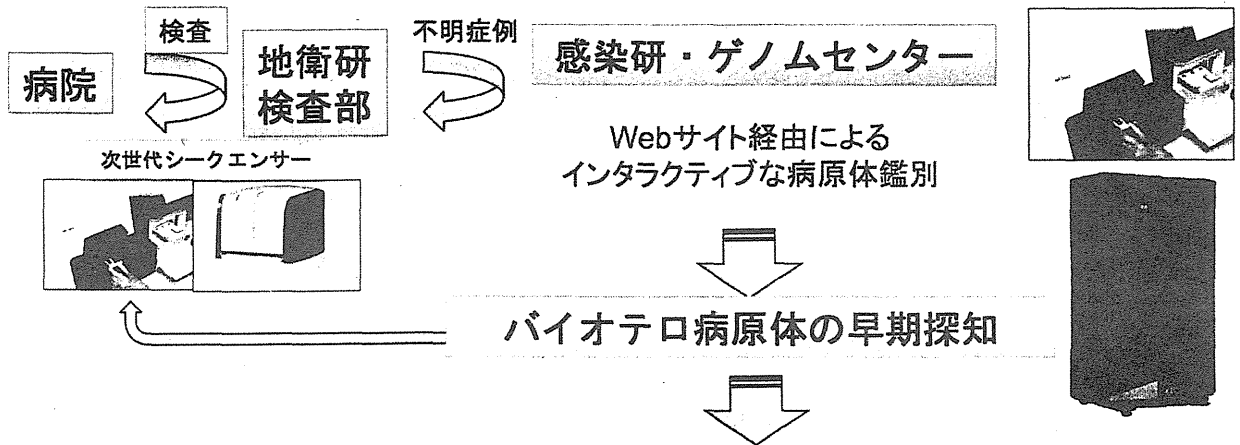


図1 ベンチトップ型・次世代シーケンサーによる迅速な網羅的病原体検査の概要。
 大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、
 ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった。

バイオテロ対策のための網羅的病原体検索



ゲノムワイドSNPs検査による病原株の由来推定

WHO指定バイオテロ病原体（カテゴリーA）のゲノムデータベース（感染研・ゲノムセンター）
 ☆ 炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、鼻疽・類鼻疽菌、各種ウイルス・レファレンス配列

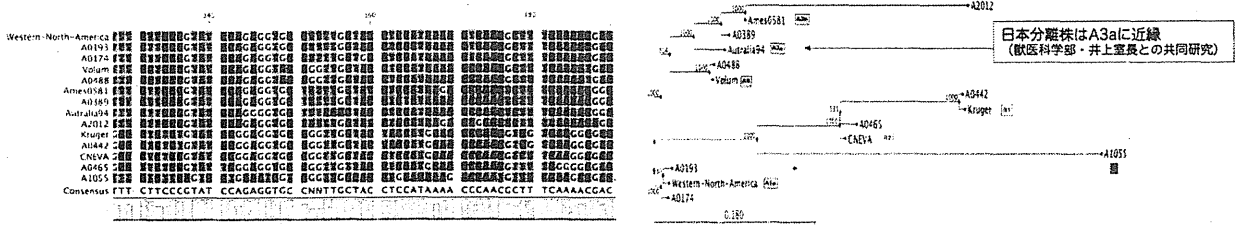
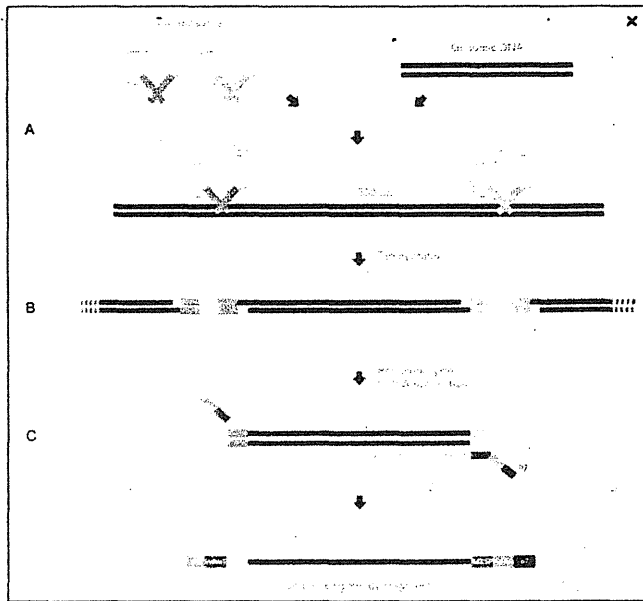


図2 ネットワーク経由による病原体検索のための解析システム（案）。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するためには、検査現場にシーケンサーの整備と、ゲノムセンターに Web interface による情報解析プログラムを用意する必要がある。

次世代シーケンサー用ライブラリー調整法

DNaseq:

illumina NEXTERA DNA sample prep kit



RNAseq:

ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit

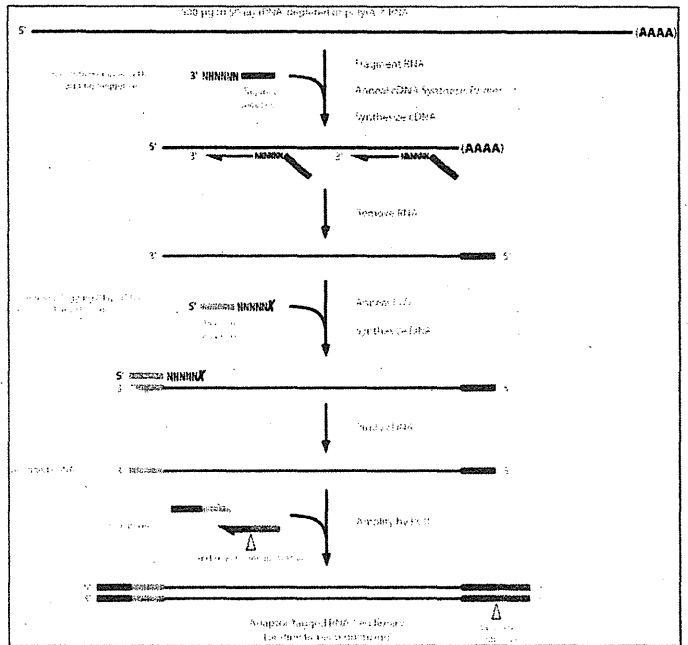


図3 次世代シーケンサー用のDNaseqおよびRNAseqのライブラリー作成法の概要

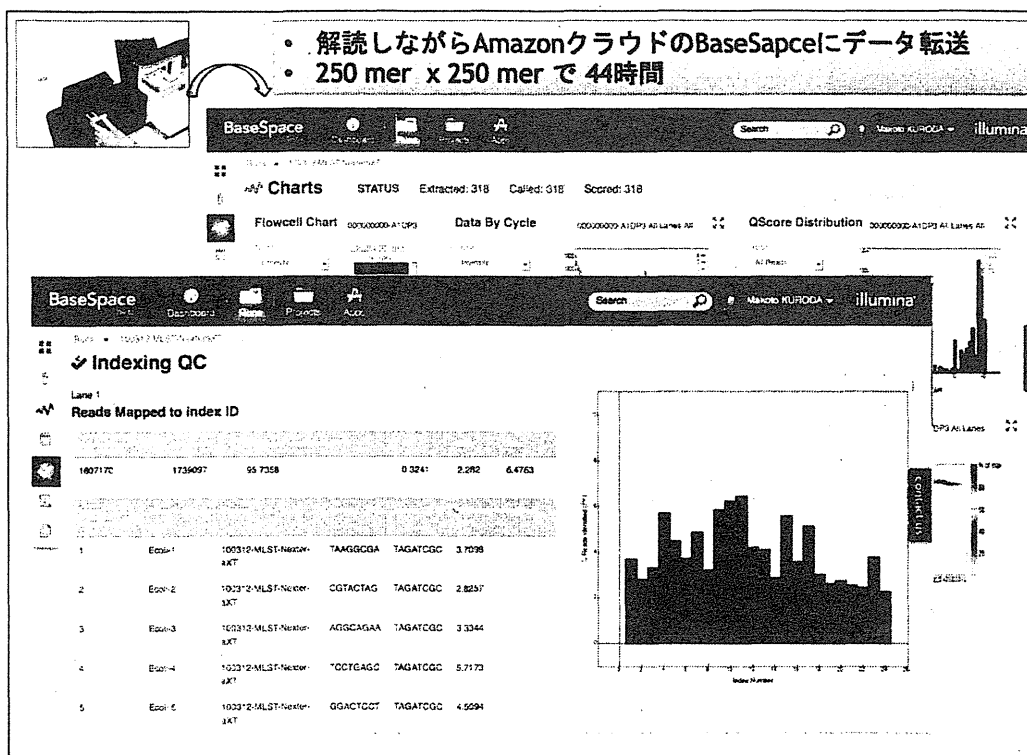


図4 次世代シーケンサーの解読リードをリアルタイムにネットワーク転送し、解読状況の確認と情報解析を行うためのクラウドサービス Illumina BaseSpace の概要。スマートフォン等で外出先からも進捗状況、結果が閲覧できる。図は24種類の検体を一度に解読して分類できている結果を示している。

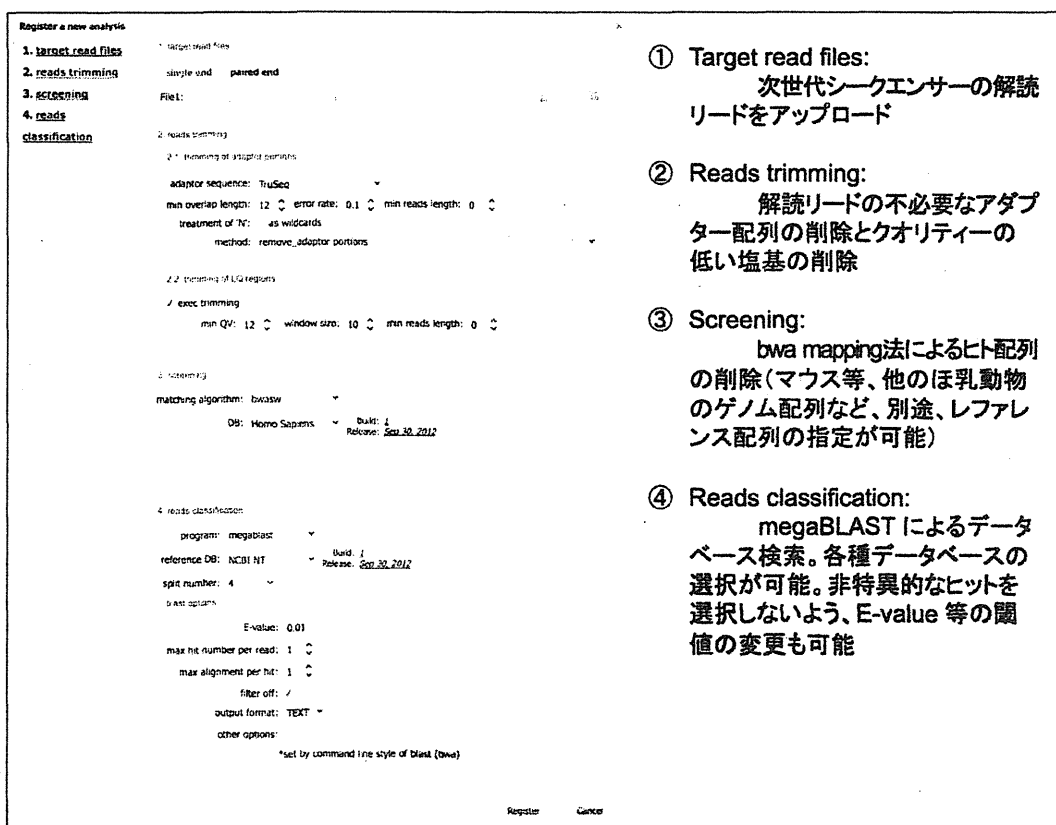


図5 臨床検体からダイレクトに網羅配列解読したリード配列の情報解析パイプライン

1. target read files

single end paired end

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

File1:

2. reads trimming

2.1. trimming of adaptor portions

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

adaptor sequence: TruSeq

min overlap length: 12 error rate: 0.1 min reads length: 0

treatment of 'N': as wildcards

method: remove_adaptor portions

2.2. trimming of LQ regions

exec trimming

min QV: 12 window size: 10 min reads length: 0

図6 次世代シーケンス・解読リードのアップロードとクオリティトリミング

3. screening

matching algorithm: bwasw

DB: Homo Sapiens B
Rele

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

図7 bwa mapping 法による解読リードからヒト配列に該当するリードを削除。適宜、レファレンスファイルの変更・指定が可能。

4. reads classification

program: megablast
 reference DB: NCBI NT
 split number: 4
 blast options

Build: 1
 Release: Sep 30, 2012

E-value: 0.01

max hit number per read: 1

max alignment per hit: 1

filter off:

output format: TEXT

other options:

*set by comn

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

```

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits)     Value
gb|CP003301.1| Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2071, comple... 198 5e-48
>gb|CP003301.1| Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2071, complete genome
Length = 5312586
Score = 198 bits (100), Expect = 5e-48
Identities = 100/100 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1      aatcactaccgtactggctaaaacctacggcgggtgctgctcgcgcattcgaccagatoga 60
              |||
Sbjct: 5005543 aatcactaccgtactggctaaaacctacggcgggtgctgctcgcgcattcgaccagatoga 5005484

Query: 61     taacgcgcggaagaaaaagctcgtggtatcaccatcaac 100
              |||
Sbjct: 5005483 taacgcgcggaagaaaaagctcgtggtatcaccatcaac 5005444
  
```

図8 ヒト配列削除後に残った解読リードに病原体配列が内在している可能性がある。Megablast 相同性検索にてテキストベースの結果が得られる (例: 図右下)。

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）
重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究
分担研究報告書

未知のウイルスを検出するための新しい分離法・同定法の開発

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第1部
東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター
水谷哲也

研究協力者 国立感染症研究所 野田雅博・黒田誠・木村博一
鳥取県衛生環境研究所 浅野康子
東京女子医科大学 濱田洋通
山形衛生研究所 水田克己
群馬衛生環境研究所 塚越博之
東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 古谷哲也

研究要旨

RDV 法は特別な機器を必要とせず、ウイルス分離後 2 日間でウイルスを網羅的に解析できるシステムである。RDV 法はウイルス分離後の培養上清を出発材料としており、昨年度から鳥取県衛生環境研究所などへ RDV 法を技術移転し不明検体を解析してきた。その一方で、重症呼吸器感染症においては、迅速かつさらに網羅的な対応も要求される。また、緊急性はないが、数多くの検体を解析する場合もある。そこで、本年度は次世代型シーケンサーを用いて簡便で迅速なシステム、および多検体を同時に解析するシステムを構築した。このシステムを用いて、重症呼吸器感染症の網羅的解析を実施した。本研究は、将来的に衛生研究所において次世代型シーケンサーを使用して解析する際の基礎的情報になると考えられる。

A. 研究目的

本研究において、我々は特別な機器を用いないウイルスの網羅的解析法として RDV 法を実施してきた。RDV 法はウイルス分離後の網羅的解析であり、ウイルス学においてウイルス分離は重要な手法であるという観点から開発・改良してきた。RDV 法には検体から直接ウイルスを網羅的に検出できるバージョンもあるが、多くのバージョンはウイルス分離の培養上清を出発材料としている。ウイルス分離はウイルス学の基礎であり、ウイルス検出の現場では最も

基礎的かつ重要な手技である。私たちの研究室では、ウイルス分離後の RDV 法による解析も数多く実施している。本年度も、昨年度に引き続き RDV 法を衛生研究所に技術移転し、不明検体の解明に役立てていただくことを目的としている。

その一方で、デスクトップ型の次世代型シーケンサーの普及により、もはやハイスループットシーケンスは限られた研究者だけが使用する技術ではなくなった。そこで、本研究ではウイルス分離を重要と考える一方で、重症呼吸器感染症患者の検体中

に含まれる原因ウイルスを緊急に同定しなければならぬケースを想定して、次世代型シーケンサーを用いて呼吸器症状の検体を直接解析することを目的とした。また、将来、衛生研究所において次世代型シーケンサーを購入・使用する際に、基礎となるプロトコールになることを想定して、多検体を同時に解析するシステムを構築した。

B. 研究方法

次世代シーケンシング

本研究は、国立感染症研究所・感染症情報センターの木村博一先生・野田雅博先生の研究チームの主導でおこなわれた。

鳥取県立環境衛生研究所（浅野先生）においてすでに採取されていた、主として呼吸器症状を呈す患者の咽頭ぬぐい液 96 検体と、咽頭ぬぐい液から RD 細胞、Vero 細胞を用いてウイルス分離した培養上清 4 検体から RNA を抽出した。多検体のシーケンスを同時に行うため、10 検体ずつ RNA を 10 個のグループにプールし、DNase 処理後に RNAseq 法によるライブラリー調製を行い、シーケンス時にはインデックス配列によって個々のグループを識別するようにした。また、東京女子医大（濱田先生）から、発熱と急性呼吸不全で入院し急性喉頭炎と診断された患者（重症呼吸器感染症）の咽頭ぬぐい液と便がすでに採取されていたので、両検体から RNA を抽出して、DNase 処理後、それぞれ別個に RNAseq 法によってライブラリーを調製した。調製されたライブラリーは卓上次世代型シーケンサー（イルミナ社 MiSeq）でシーケンスをおこない、解析ソフトウェア（CLC Genomics Workbench, Filgen）によってコンティグの構

築をおこなった後、Local BLAST により NCBI サイトからダウンロードされたウイルスゲノム・リファレンス・データベースに対する各コンティグシーケンスの相同性を調べた。ウイルス配列に相同性が見られたコンティグシーケンスは、NCBI BLAST のサイトにおいて、ウェブ上のデータベースに対するより詳しい解析を行った。また、コンティグを構築する前の個々のシーケンス配列（50 bp）も同様にウイルスゲノム・リファレンス・データベースに対して BLAST を用いた相同性検索を行い、多くの配列が相同性を示すようなウイルス配列を検出した。

C. 研究結果

ウイルス分離を行うことなく直接原因ウイルスを同定するために、鳥取県衛生環境研究所に集められた呼吸器疾患患者の咽頭ぬぐい液を 10 検体ずつプールした 10 グループについて、咽頭ぬぐい液中のウイルス塩基配列の検出を次世代型シーケンサーを用いておこなった。ウイルス配列が検出されたグループに含まれる検体の臨床診断名を図 1 にまとめた。検体の多くは呼吸器症状を呈していたが、少数の検体は急性心筋炎（グループ 2）、突発性発疹（グループ 1）、ヘルパンギーナ、小脳失調（グループ 10）を呈していた。まず、これらのグループのシーケンスによってできたコンティグをウイルスゲノムリファレンス配列データベースにより BLAST 解析した（図 2）。その結果、10 個のグループ（各グループ 10 検体）のうち、グループ 2 からは複数のコンティグがヒトコロナウイルスに高い相同性と E-value を示すことが示された。グルー

プ3内のコンティグのひとつもヒトコロナウイルスに、ほぼ同様の相同性を示した。グループ4からは8個のコンティグがヒトエンテロウイルスに対し、73-90%の相同性を示した。これらのコンティグは3つのヒトエンテロウイルス株(B, 98, 100)に対し、ほぼ同様の相同性を持っていた。このため、この検体には新しいウイルス株が含まれる可能性もある。グループ4のコンティグのひとつはインフルエンザCに99%の相同性を示した。グループ10のコンティグ7個はヘルペスシンプレックスウイルス1に90-100%の相同性を示していた。このグループは分離ウイルス培養上清を含んでいるため、コンティグのシーケンスは分離ウイルスからのものであったと考えられる。

次世代シーケンスによる個々のシーケンス配列(50 bp)を、直接、ウイルスゲノムリファレンス配列データベースに対しBLAST解析を行った(図3)。その結果、コンティグを用いた解析で発見されたウイルス以外に、グループ5から、ヒトコロナウイルス HKU1 と OC43、インフルエンザCウイルスが検出された。

次世代シーケンスによって、グループ2, 3, 5の検体からヒトコロナウイルス HKU1 の配列が検出されたため、コロナウイルス HKU1 に特異的なプライマーを用いて、PCRにより、それぞれのグループの検体中、どの検体にコロナウイルスが含まれるかを検出した。これにより、グループ2には2検体、グループ3には3または4検体、グループ5には1検体中にヒトコロナウイルス HKU1 が含まれることが分かった(図4)。

東京女子医の咽頭ぬぐい液検体からは、

多数のコンティグからほぼ100%の相同性で、ヒトコロナウイルス NL63 が検出された(図3)。さらに同検体からは培養によってすでに検出されていた *Moraxella catarrhalis* の配列も多数のコンティグにより検出された。

本研究では、RDV法を衛生研究所に技術移転することを目的にしている。(厚生労働省の研究班における研究も含むが)本年度までに、北海道、群馬、鳥取、高知、宮崎の各衛生研究所において実際にRDV法が実施されている。また、島根衛生研究所には技術移転中である。今後も多くの衛生研究所で不明検体の解析に役立てていただきたいと考えている。

D. 考察

鳥取県衛生環境研究所に集められた呼吸器疾患患者の咽頭ぬぐい液中に含まれるウイルス塩基配列の次世代型シーケンサーによる解読により、まずコンティグを構築し配列網羅的解析を行った結果、呼吸器コロナウイルスを含む、最低4種類のウイルスが検出された。ヒトコロナウイルス HKU1 に特異的なプライマーを用いたPCRにより、グループ2では2検体、グループ3には3または4検体、グループ5には1検体中にヒトコロナウイルス HKU1 が含まれることが分かった。これらの結果から、次世代シーケンスをいくつかの検体をプールして行い、更にPCRによりどの検体に検出されたウイルスが含まれていたかを調べることで、多数の検体の次世代型シーケンスによるスクリーニングを比較的容易に行えることが示された。この解析では、コンティグを構築する前のショートリード