

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い無い。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）。

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。

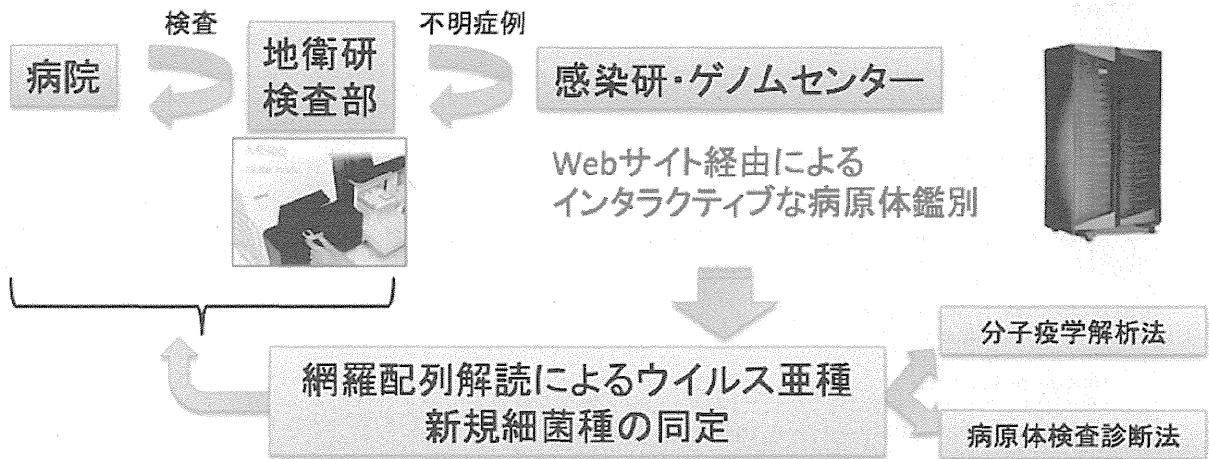


図1 ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検出のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

次世代型病原体検出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。

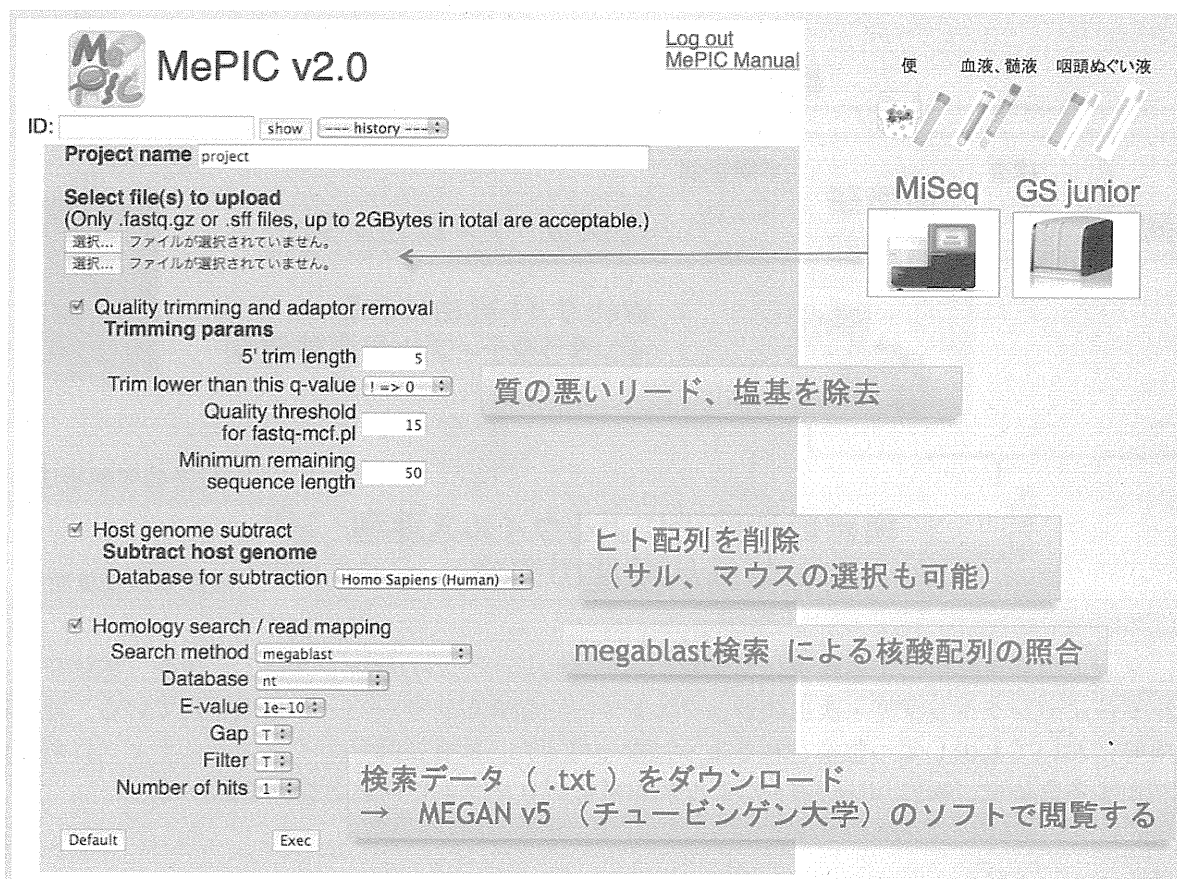


図3 MePICの操作画面の仕様。NGSリードから i)質の悪いリード、塩基の除去、ii)臨床検体に内在するヒト配列の削除、iii) megablast 検索による病原体検索。この i - iii までの一連の流れを一度に完結させるパイプライン。

➤ 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, Shimizu 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, Mikoshihara 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 cardiovirus (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

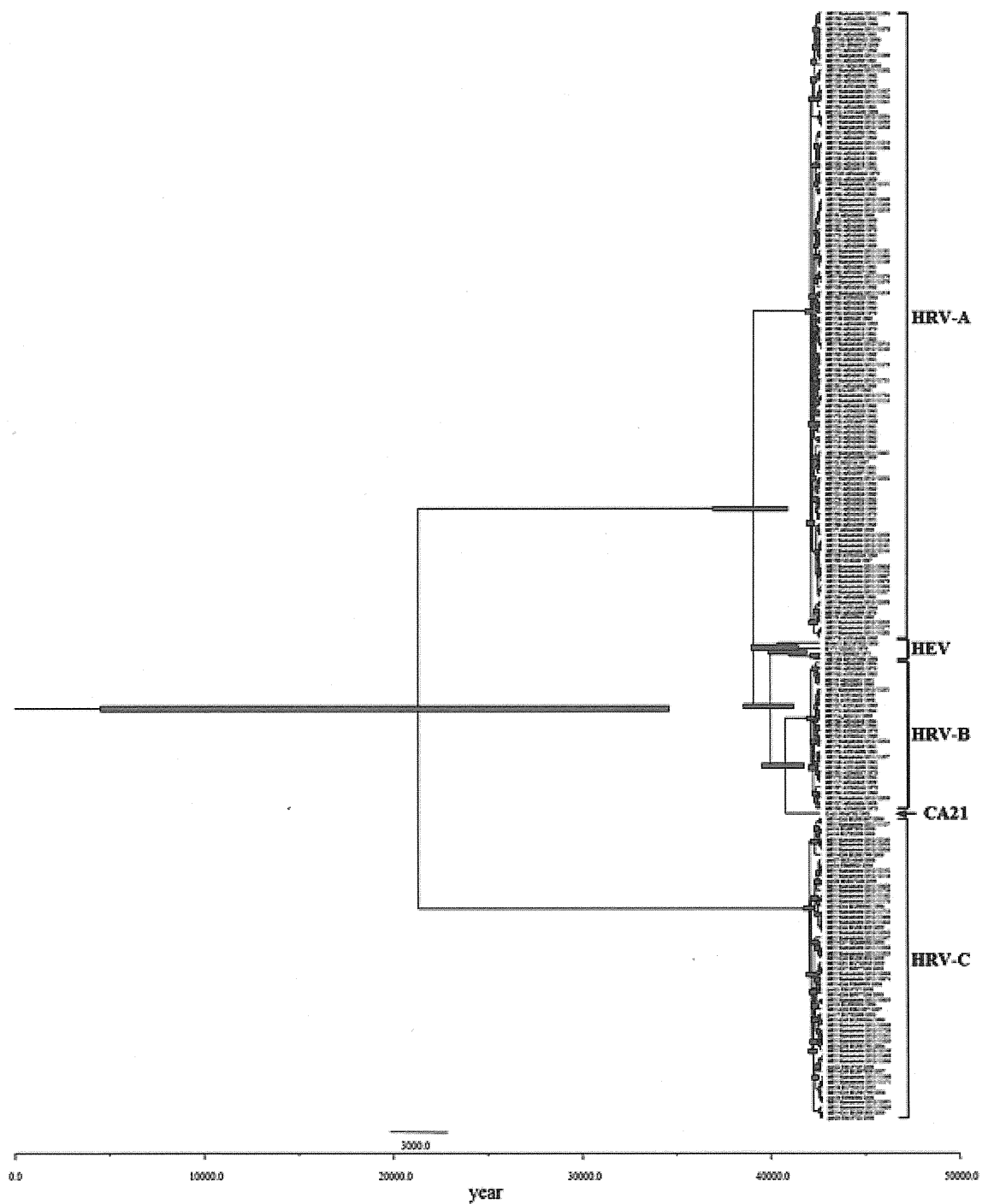


図1 HRV 分子系統樹(VP4/VP2 領域)

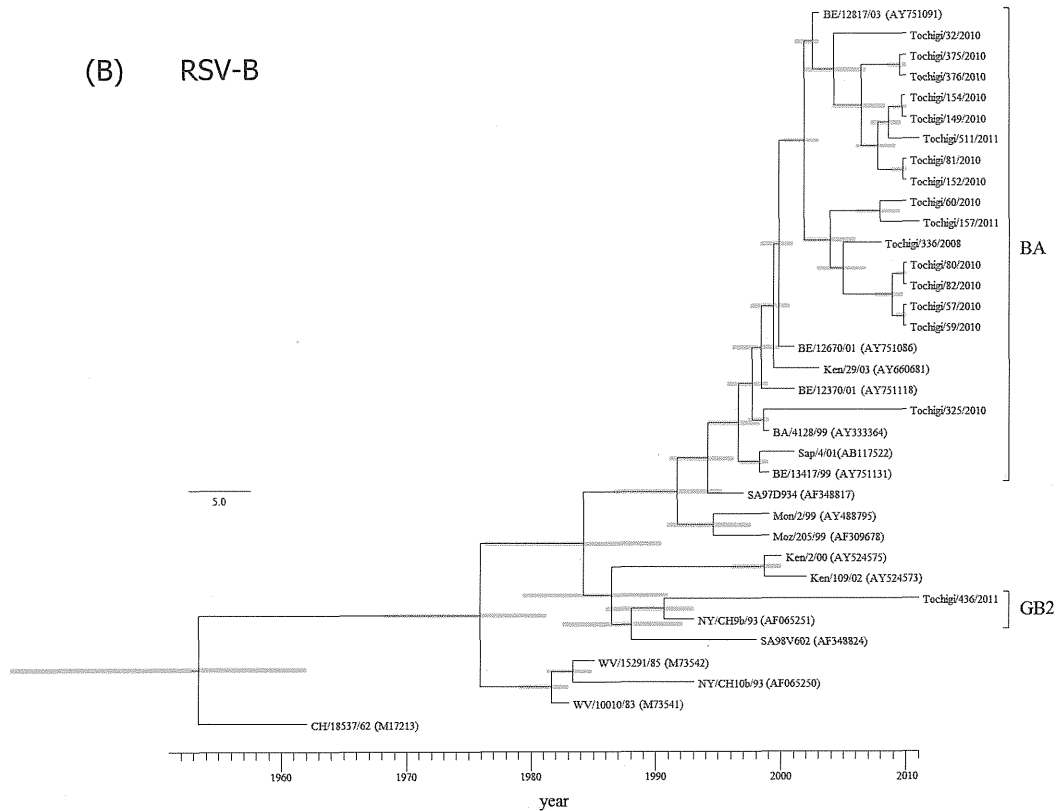
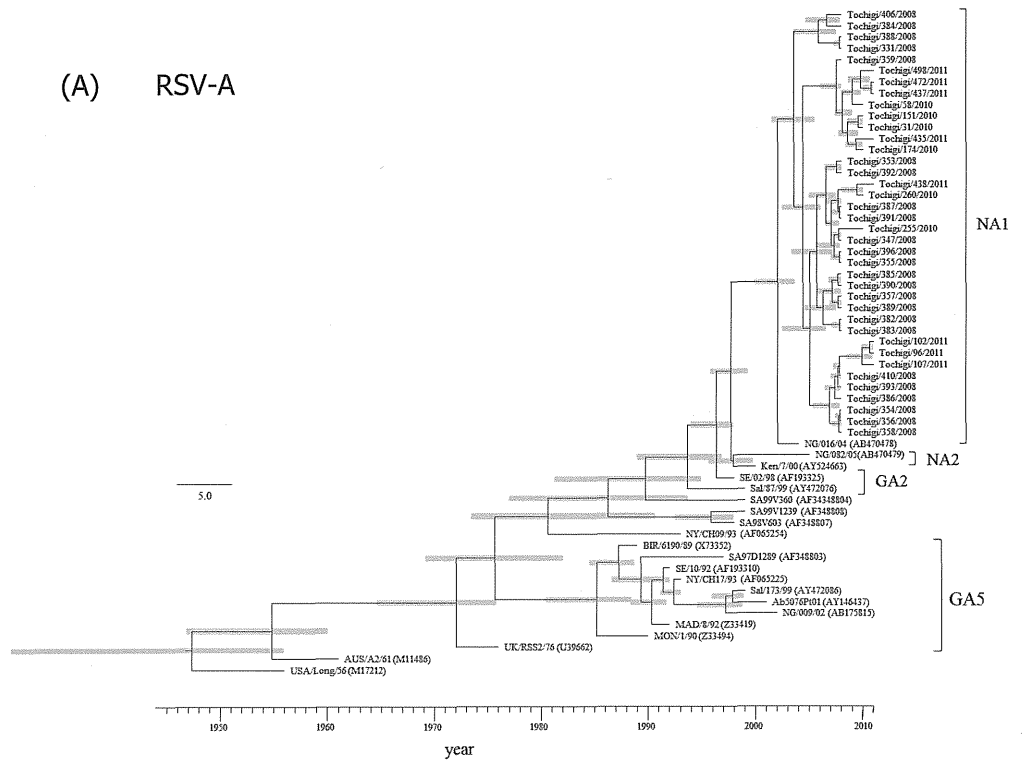


図2 RSV分子系統樹(G遺伝子)

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 邦寿 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。

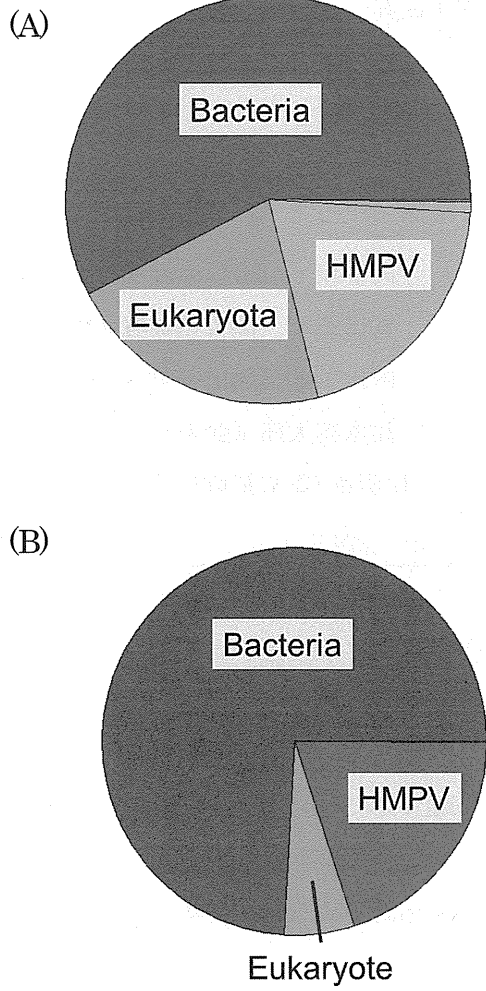


図1 HMPV 分離株および咽頭拭い液からの網羅的病原体検索 (検出された生物種の割合)