

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

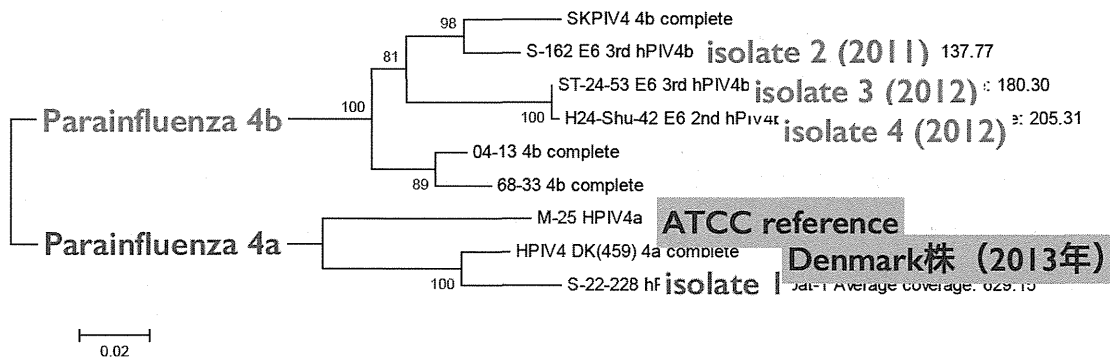


図 1. Parainfluenzavirus 分離株のゲノム配列による系統樹解析

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

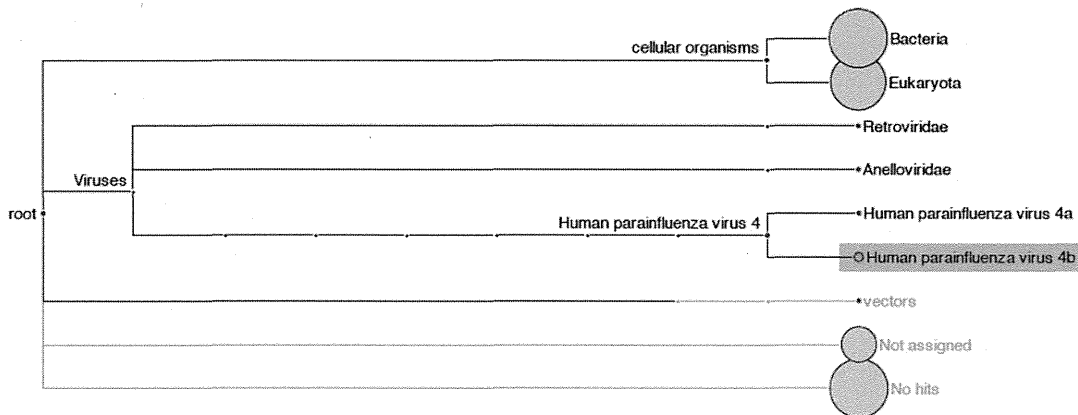


図 2. 臨床検体のゲノム解析

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 のプロトコールに準拠して、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ールには、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

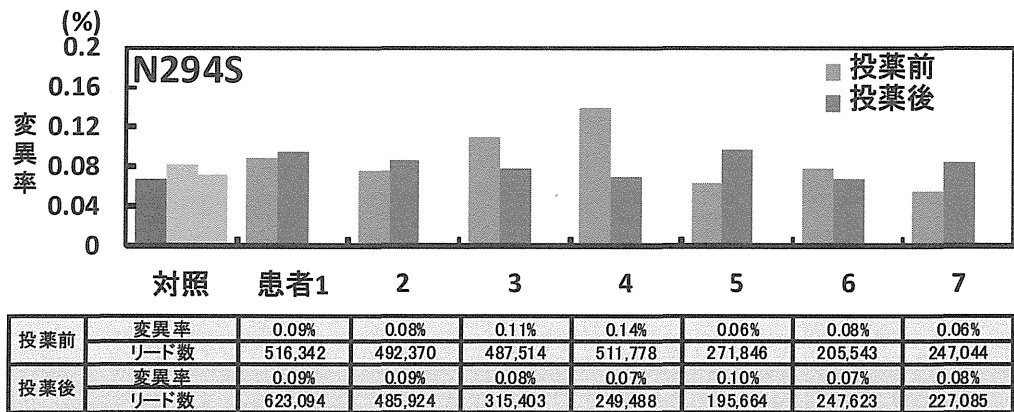
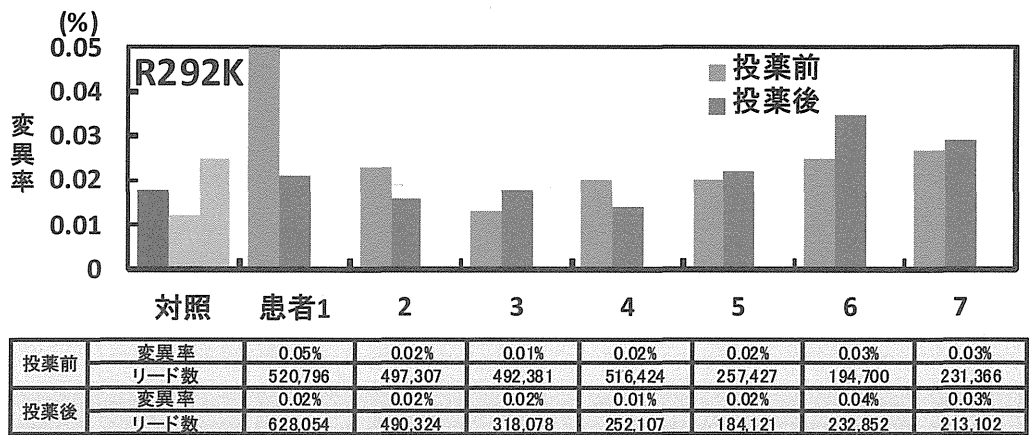
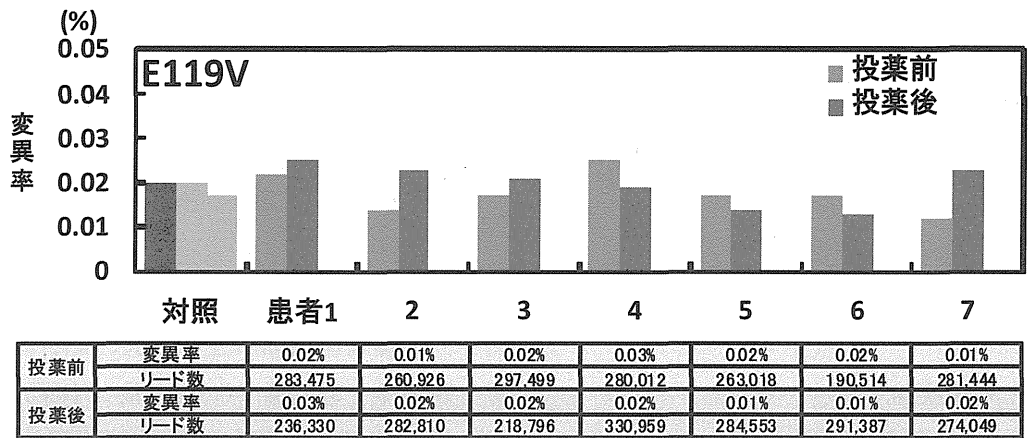


図1 次世代シーケンサーによるペラミビル耐性A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出

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。