

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

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

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

E. 結論

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

F. 参考文献

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

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

- detected in patients with acute respiratory infection in Kumamoto prefecture, Japan 2011–2012, *Infect Mol Evol.* 21:90-102, 2013.
- 6) Abe M, Tahara M, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, Fukuhara H, Mizuta K, Maenaka K, Ami Y, Esumi M, Kato A, Takeda M. Tmprss2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol.* 87(21):11930-11935, 2013.
 - 7) Matsuda S, Nakamura M, Hirano E, Kiyota N, Omura T, Suzuki Y, Noda M, Kimura H. Characteristics of human metapneumovirus infection prevailing in hospital wards housing patients with severe disabilities. *Jpn J Infect Dis.* 66(3):195-200, 2013.
 - 8) Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita A, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol.* 57(9):655-659, 2013.
 - 9) Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M. Elevated macrophage inflammatory protein 1 α and interleukin-17 production in an experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol.* 161(2):129-137, 2013.
 - 10) Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Shimizue Y, Ito S, Aokia Y, Ikeda T, Abiko C, Kuroda M, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: Findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol.* 58(1):188-193, 2013.
 - 11) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo H, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 18:168-173, 2013.
 - 12) Saraya T, 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 fi-

broblasts. 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 saffold 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 (AP-CAACI), 2013; Nov 14-17, Taipei, Taiwan.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

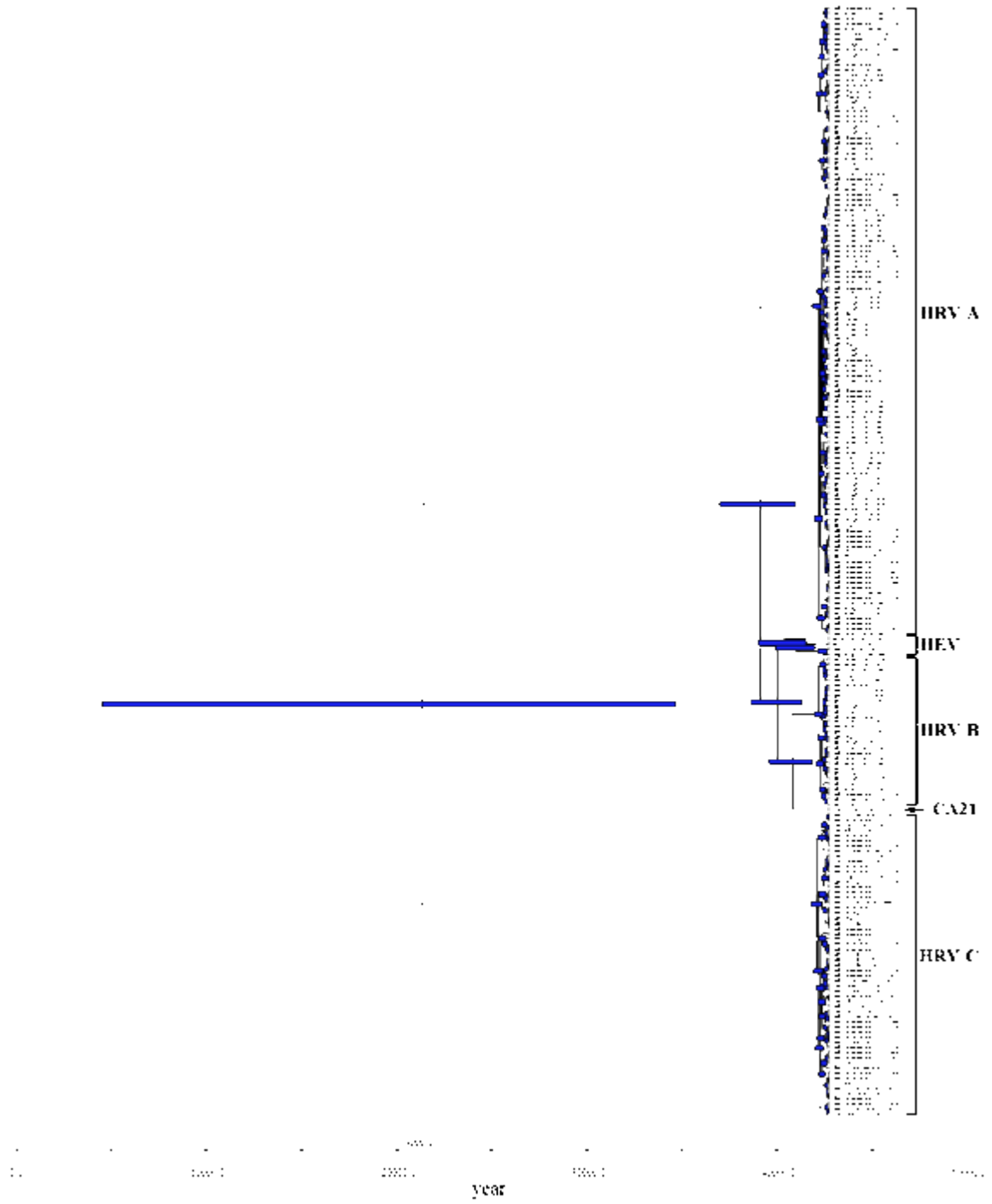


图 1 HRV 分子系統樹(VP4/VP2 領域)

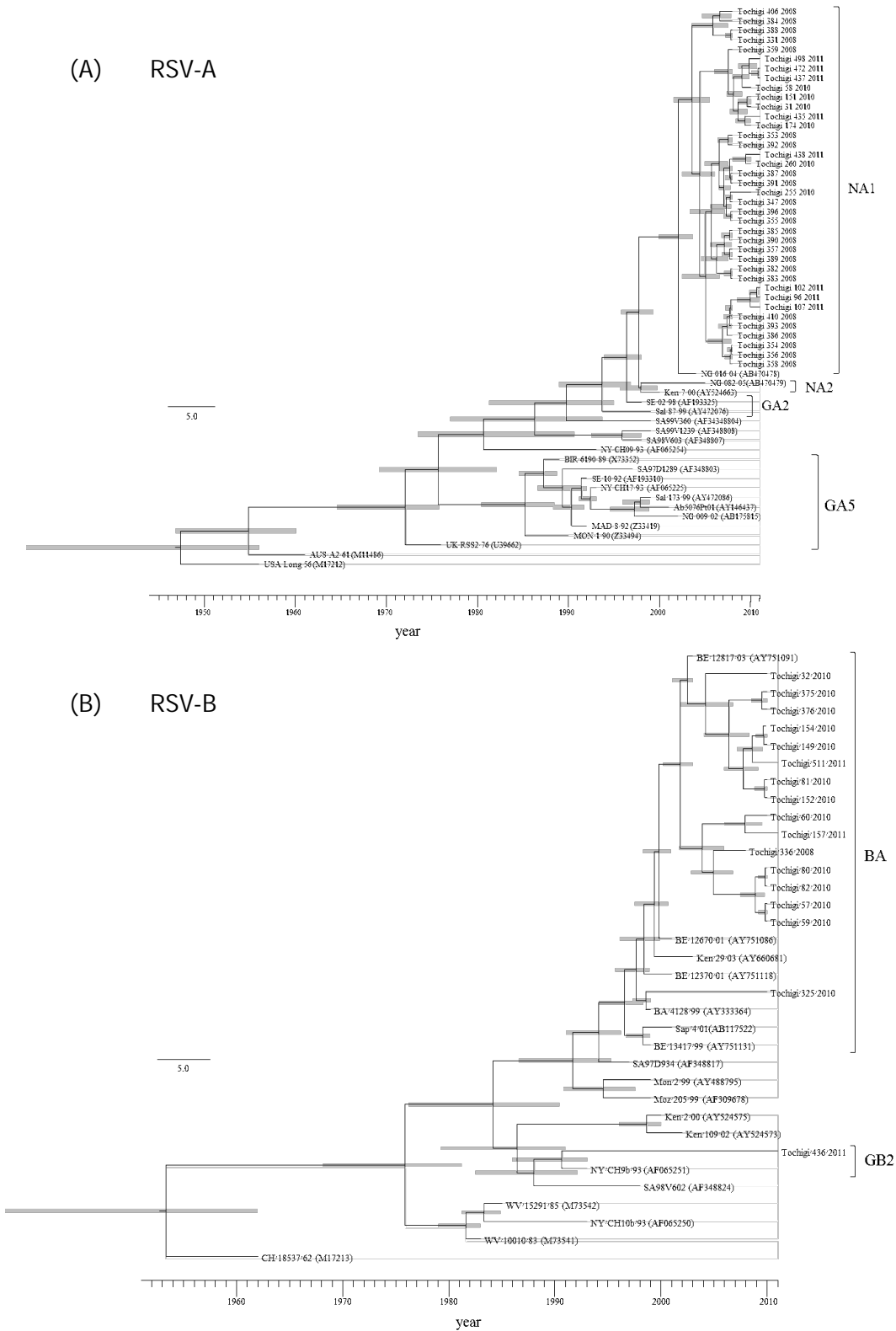


図2 RSV 分子系統樹(G 遺伝子)