

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

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事ができる。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。

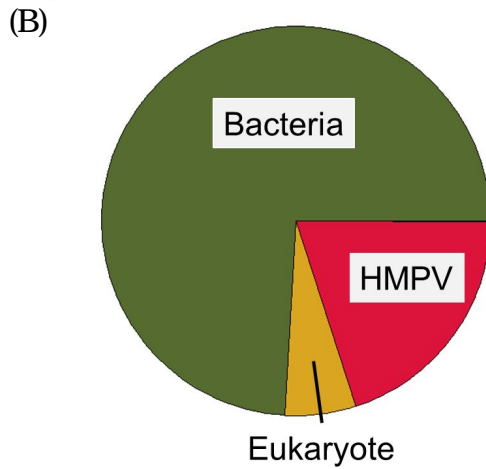
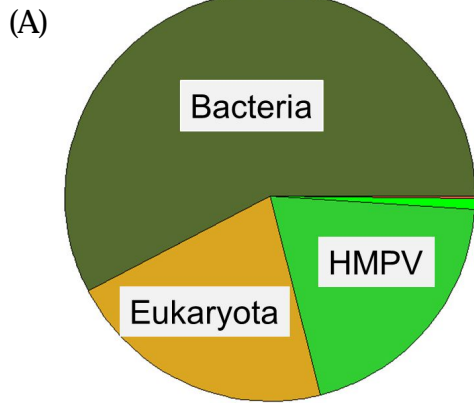


図1 HMPV 分離株および咽頭拭い液からの網羅的病原体検索 (検出された生物種の割合)