

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、サンガーシーケ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、サンガーシーケ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 I D	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

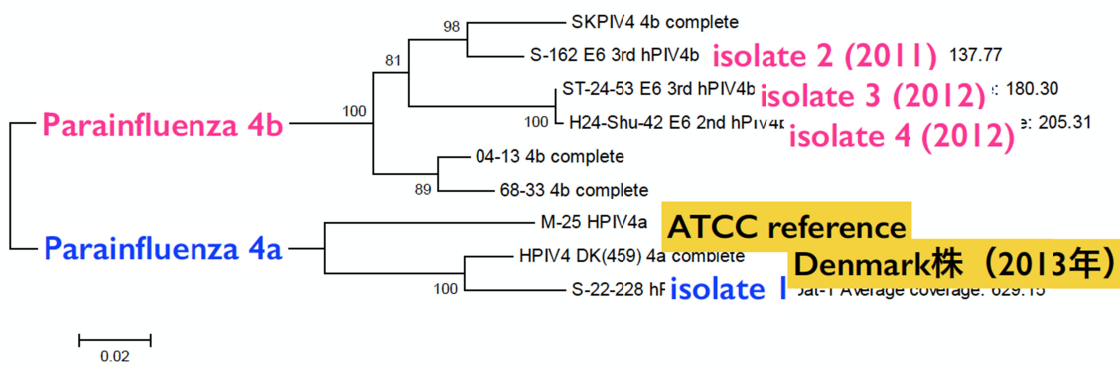


図 1 . Parainfluenzavirus 分離株のゲノム配列による系統樹解析

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

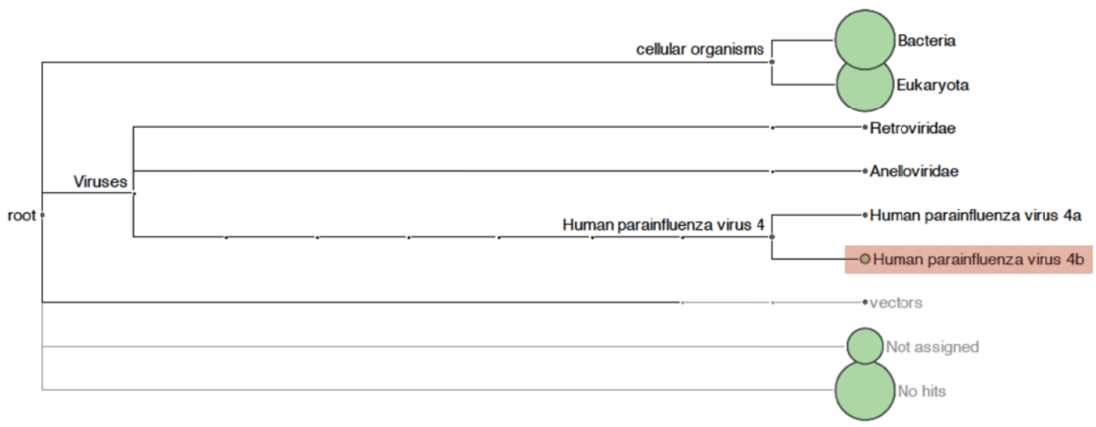


図 2 . 臨床検体のゲノム解析