

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、これまでは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-Blair 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-

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、検体からの DNA あるいは RNA の抽出、塩基配列決定原理（装置）に応じたサンプル調製、

解析データの処理、の3つの工程で実施される。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。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。

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、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真一先生、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鮎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

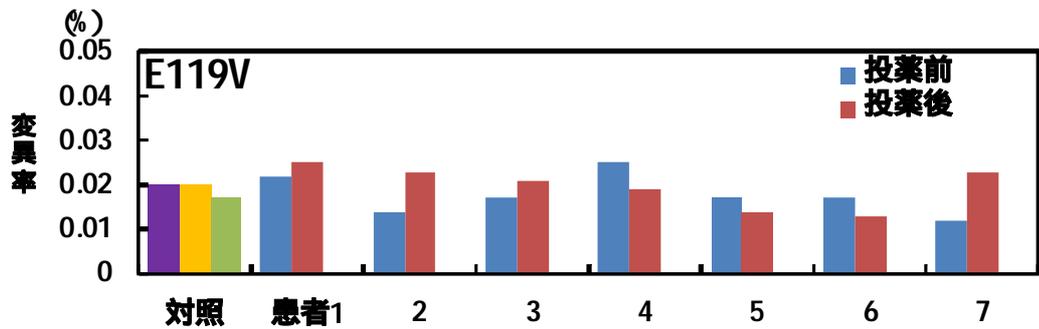
1) Obuchi M, Hatasaki K, Tsubata S, Kaneda H, Shinozaki K, Tsuji T, Kasei M, Konishi M, Inasaki N, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Sata T and Takizawa T.

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

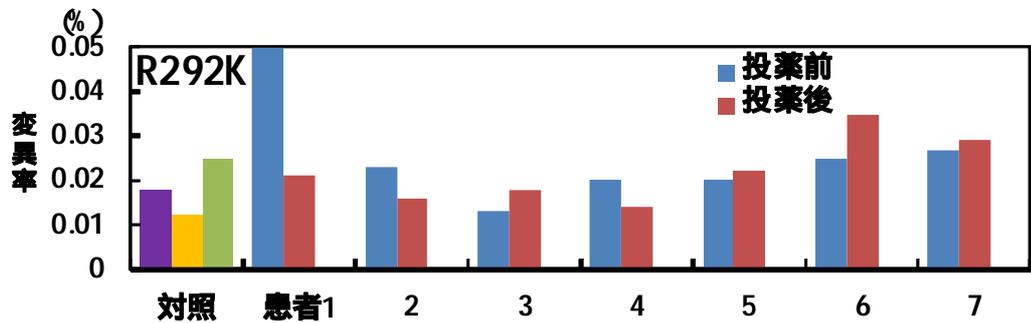
2) 小淵正次、畑崎喜芳、津幡眞一、金田尚、篠崎健太郎、辻 隆男、鮎井正春、小西道雄、稲崎倫子、名古屋(小原)真弓、堀元栄詞、佐多徹太郎、滝澤剛則. ノイラミニダーゼ阻害薬投与小児患者における薬剤耐性 A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

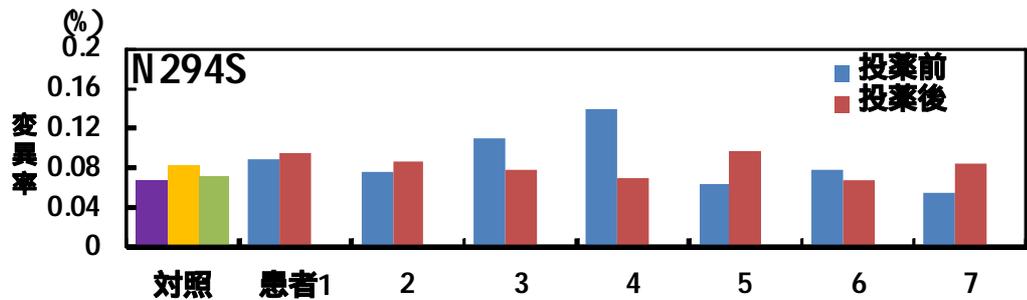
なし



投薬前	変異率	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%
投薬前	リード数	283,475	260,926	297,499	280,012	263,018	190,514	281,444
投薬後	変異率	0.03%	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%	0.02%
投薬後	リード数	236,330	282,810	218,796	330,959	284,553	291,387	274,049



投薬前	変異率	0.05%	0.02%	0.01%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%
投薬前	リード数	520,796	497,307	492,381	516,424	257,427	194,700	231,366
投薬後	変異率	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.02%	0.04%	0.03%
投薬後	リード数	628,054	490,324	318,078	252,107	184,121	232,852	213,102



投薬前	変異率	0.09%	0.08%	0.11%	0.14%	0.06%	0.08%	0.06%
投薬前	リード数	516,342	492,370	487,514	511,778	271,846	205,543	247,044
投薬後	変異率	0.09%	0.09%	0.08%	0.07%	0.10%	0.07%	0.08%
投薬後	リード数	623,094	485,924	315,403	249,488	195,664	247,623	227,085

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)

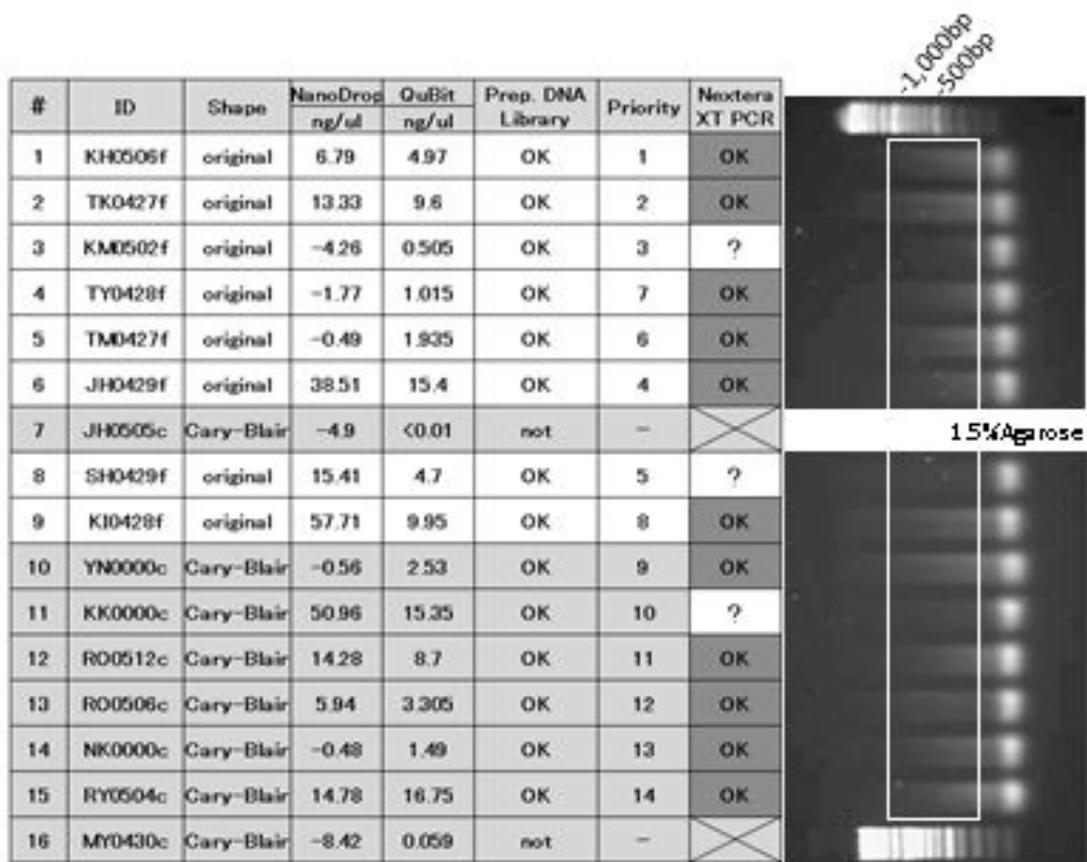


図 2 . 便 DNA の定量と NexteraXT によるライブラリーの検定