

「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、次世代シークエンサー（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クエンサー（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。 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。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。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、シークエ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