

厚生労働科学研究費補助金「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」分担報告書

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

急性呼吸器感染症の検査において、原因病原体の特定に至らない検体が多く存在する。近年の検査技術の向上、例えばウイルス高感受性細胞の開発や、マルチプレックス検査法、次世代シーケンサーの導入により、不明とされてきた病原体が明らかになる可能性がある。また本研究班のような国際的な研究者間の情報交換により、検査技術の向上、および新型コロナウイルス発生のような緊急の国際的な感染症発生時において、担当者の円滑な情報交換のできることが期待できる。しかし一方で、最新の技術を駆使してもなお、検出できない病原体があることも事実である。中国側の研究でも今のところ新規病原体の検出には成功していない。本年度我々は、実際に地方衛生研究所より原因不明の上気道炎検体入手し、病原体の分離精製及び同定を行った。その結果検出された病原体は風疹のワクチン株であり、急性呼吸器感染症とは無関係の予防接種に由来するウイルスであることがわかった。本結果は、不明病原体の分離同定の難しさとリスクを示す一例である。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) は小児死亡原因の第一位であり、世界では毎日 5,000 人の子供が死亡しているといわれている。多くの ARI ウイルスは咳を介して感染することから感染力が強く、瞬く間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、我々研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくる必要があると考えられる。我々は中国 CDC のインフルエンザ研究センターと連絡を取り、ARI の共同研究体制の構築を試みている。

一方、急性呼吸器感染症の検査の結果、原因を特定できない検体は多数存在する。このような検体入手し、詳細に検査することで、新しい病原体を発見することが、本共同研究の目的である。本課題について中国の研究者と検査体

制と現状について意見交換することの意義は大きい。本年、我々は実際に、地方衛生研究所で診断できなかった患者由来の検体入手し、病原体の特定をおこなうことで、ウイルスの分離同定を行う上での問題点を明らかにした。

B. 研究方法

山形県衛生研究所より提供を受けた不明病原体は、VERO-E6 細胞に感染後 1 週間程度で細胞変性を誘導する。発熱および呼吸器症状の患者の咽頭拭い液より、VERO-E6 細胞を用いて分離され、感染価の計測から、培養上清中に 10^7 乗 PFU/ml 程度の病原体が存在することが分かった。一般的な呼吸器ウイルスの PCR 検査は全て陰性であり、次世代シーケンシング (Miseq) の解析では、風疹 23 read、パラインフルエンザ 2 型が 66 read と、わずかに検出され、研

究室内での病原体遺伝子の混入が疑われた。

次に病原体の精製を試みた。500mlの培養上清を用い、常法の PEG 沈殿法にて濃縮後、PBS にて溶解し、ショ糖密度勾配遠心分離法 (15%、40%ショ糖) にて濃縮精製を行った。濃縮画分の感染価を確認後、電子顕微鏡と次世代シーケンシングを行い、病原体を決定した。

C. 研究結果

電子顕微鏡像では、エンベロープを有する直径 90nm 前後の円形粒子が見られた。さらに次世代シーケンスの結果、風疹ウイルスが、4796 read 検出された。この配列は風疹ワクチン株に3つの変異が含まれるものであった。RK 細胞での細胞変性の形態と、風疹抗体による中和、ウイルス増殖の温度感受性の試験の結果は、いずれもこの病原体が風疹ワクチン株であることを示すものであった。

D. 考察

通常、急性呼吸器症状を示す患者からの検体で、風疹ウイルスの検査を行うことは無いため、ワクチンの患者体内での残存に気付かなかった。患者情報より、本検体の採取から 22 日前に MR ワクチンが接種されていたことが分かっており、一回目の次世代シーケンスデータから、風疹ウイルスを疑うことは可能であったと思われる。病原体検出の際には患者情報の事前の精査が重要である。

一方、病原体不明と判断された検体であっても、そのほとんどが検体採取のタイミングや現行検査法の感度の限界による、既知のウイルスの検査漏れであると考えられ、詳細な病原体解析に進む前段階で、適切に検体をふるい分けるための経験の蓄積とそのプロトコル化が重要であると思われる。

E. 結論

山形県衛生研究所より提供を受けた、VERO-E6 細胞で増殖する不明病原体は、MR ワクチン由来の風疹ワクチン株であると考えられる。本研究では次世代シーケンス、細胞培養、病原体精製、電子顕微鏡などで多くの人員と費用を費やしたが、得られた結果は取るに足りないものであった。しかし行った過程は不明病原体を明らかにするためには必要な作業であり、さらに我々がワクチン株の特定に至ったことは、今回、新規病原体の検出システムを構築できたことを意味する。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

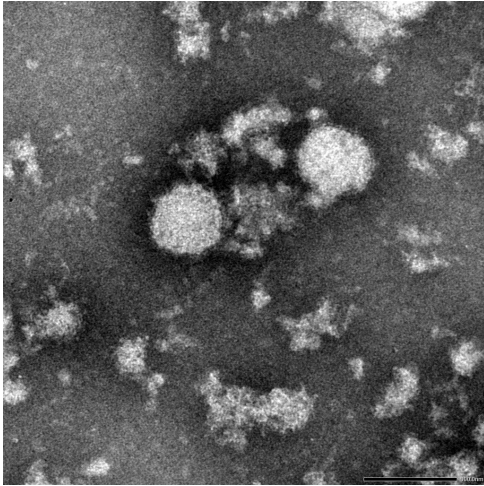


図1 不明病原体の電子顕微鏡写真

VERO-E6 細胞の上清から精製濃縮された病原体は、不鮮明なエンベロープを有する直径 90nm 前後の円形粒子であった。

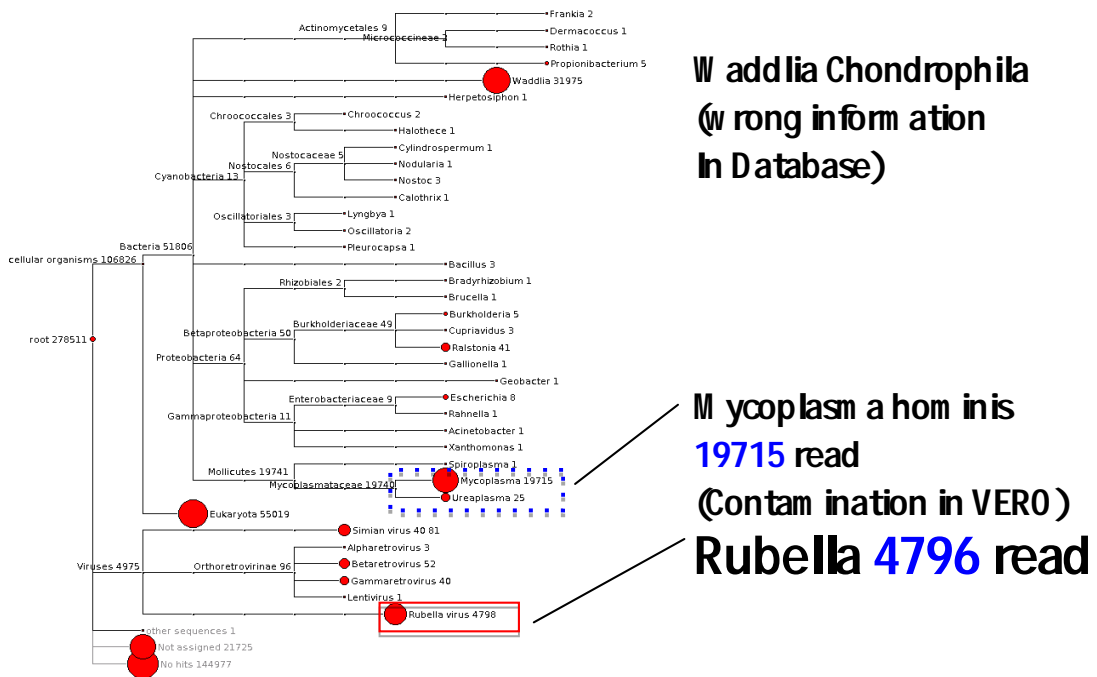


図2 不明病原体の次世代シーケンス

山形県衛生研究所から提供された VERO-E6 細胞でよく増殖する病原体は、発熱、呼吸器症状を示す小児の咽頭拭い液に由来する。この不明病原体を精製し同定したところ、MR ワクチンに由来する風疹のワクチン株であった。

Title

Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections

Name

Shutoku Matsuyama

Department of Virology 3, National Institute of Infectious diseases (NIID), Japan

Abstract

An unknown pathogen provided from the Yamagata prefecture institute, which isolated from acute respiratory disease and grow well in VERO-E6 culture cells. We first assessed to identify the pathogen in it using the next generation sequencing (NGS) technique, however no clear evidence of pathogen was seen in the results. Next we purified and concentrated the pathogen by using the precipitation with Polyethylene Glycol and the density gradient centrifugation with sucrose. About 10^8 to 10^8 power of pathogen/ml was concentrated, and a lot of envelope virus like particle was detected in electron microscopy, further the NGS revealed this pathogen was a vaccine strain of rubella virus. Our experience suggests that the working and cost is required for the identification of pathogen.