

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<sup>®</sup> (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とする分子量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 v3<sup>®</sup> (Illumina) を用いて Miseq<sup>®</sup> (Illumina)により網羅的遺伝子配列の読み取りを行った。Mepic server により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<sup>1</sup>。その結果を MEGAN にて類似性が見られた生物種の一覧図を作成し、さらに、RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の増幅を行い得られた塩基配列を用いてNJ法により分子系統樹を作成した。なお、ヒト由来の遺伝子を削除することによりヒト由来遺伝子の解析は行わず、個人情報に結びつく情報の解析は行わなかった。

### C. 研究結果

群馬県内でエンテロウイルスが流行している時期に、採取された咽頭ぬぐい液 8 検体を材料として NGS 解析を行った。その結果、5 検体からウイルス遺伝子を検出する事が出来、4 検体はコクサッキーウイルス A 群 6 型、1 検体がパラインフルエンザウイルス 1 型であった。いずれのウイルスも RT-PCR 法により確認することができた。検出された遺伝子の中でコクサッキーウイルス A 群 6 型の検出リード数は 2902 本から 124 本であったのに対して、パラインフルエンザウイルス 1 型の解読リード数は 53 本であった。パラインフルエンザウイルス 1 型の遺伝子を RT-PCR 法により増幅し、得られた塩基配列から、NJ 法により分子系統樹を作成した(図 1)。その結果、2010 年ころに米国で検出されたウイルス (HPIV1/WI/629-D02039/2009) と近縁であることがわかった。

不明症例では、NGS 解析を行った結果 3 検体からウイルス関連遺伝子が検出された。急性肺炎の患者の鼻汁からヒトヘルペスウイルス 6 型

が、脳症の患者の咽頭ぬぐい液および鼻汁からパラインフルエンザウイルス 2 型の遺伝子が検出された。パラインフルエンザウイルス 2 型は RT-PCR で確認できたが、ヒトヘルペスウイルス 6 型は PCR 法により確認できなかった。検出されたパラインフルエンザウイルス 2 型の解読リード数は、166 本であった。一方で、ヒトヘルペスウイルス 6 型の解読リード数は 2 本と少なかった。得られたパラインフルエンザウイルスの塩基配列から、NJ 法により分子系統樹を作成した(図 2)。その結果、2001 年にフランスで検出された株 (Lyon/20283/2001) と近縁であることがわかった。

### D. 考察

本研究により、NGS で解読リード数が 50 本程度読めているならば、RT-PCR で検出が可能であることが分かった。さらに、エンテロウイルスに代表されるようなウイルスの流行期では、流行しているウイルスとは異なるウイルスも検出されるため、NGS の様な網羅的な検査法により幅広い病原体を検出する事は、公衆衛生上有意義であると考えられる。

さらに、臨床上重要であり原因病原体の推定が困難である症例において、NGS を活用することによって迅速に網羅的に病原体の検索を行う事は治療の方針などに有用であることから臨床上貴重なデータになる。本研究では、脳症の患者からパラインフルエンザウイルスを検出した。これまでにもパラインフルエンザが脳症と関連しているとする報告はあるが、脳症におけるパラインフルエンザウイルスの頻度は高くなくパラインフルエンザウイルスがどのように脳症に関係しているのか、今後臨床データと詳細な照合することにより明らかにしていく必要がある<sup>2</sup>。

### E. 結論

本研究により、感染症流行期における網羅的な検出法である NGS を活用することにより流行している病原体に隠れて実態が分からな

った病原体の検索も行えるため、全体の流行像を把握できる有力なツールである。さらに、不明症例では症状から推測が困難なウイルスが検出されたことから、原因の特定困難な症例における NGS の有用性も示唆された。これらのことから、NGS は既存の RT-PCR と同等の感度があり有力な検査法の一つであることが明らかとなった。しかしながら、NGS は試薬などのコストが高く検査、さらに検査法にも習熟することが必要であるため、地研で積極的に活用していくためにはさらなる検討が必要である。

#### F. 参考文献

1. Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, Ogasawara Y, Mizuta K, Kuroda M. MePIC, metagenomic pathogen identification for clinical specimens. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(1):62-5.
2. Ogunneye O, Hernandez-Montfort JA, Ogunneye Y, Ogu I, Landry D. Parainfluenza virus infection associated with posterior reversible encephalopathy syndrome: a case report. *J Med Case Rep.* 2012;6:89.

#### G. 研究発表 論文発表

1. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 2014;28C:183-191.
2. Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, Nunokawa H, Ohkuma K, Tsujimoto N, Hirao S, Wada H, Ishii H, Nakata K, Kimura H, Kozawa K, Takizawa H, Goto H. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications. *Front Microbiol.* 2014;5:410.

#### H. 知的財産の出願・登録状況 なし。

#### I. その他 謝辞

データの解析等ご教示頂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 関塚剛史先生、山下明史先生に深謝致します。

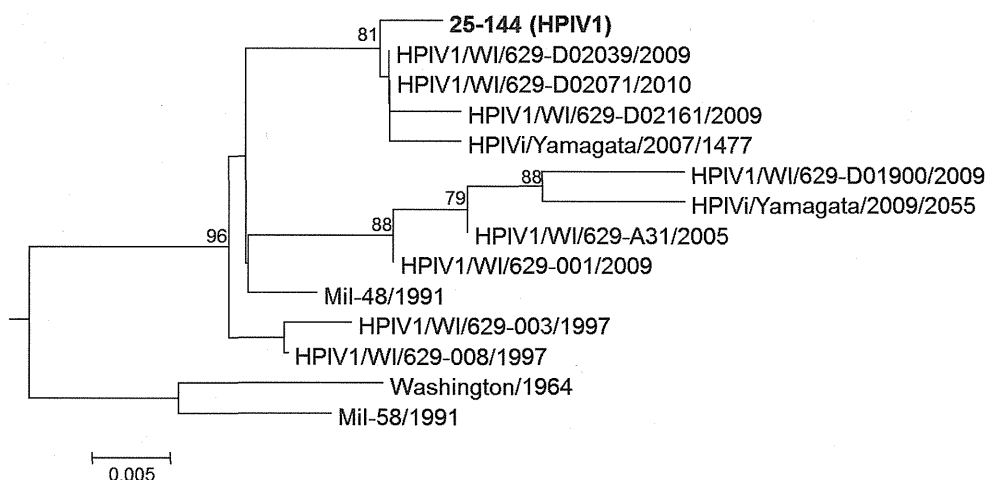


図1 エンテロウイルス疑い症例から検出されたパラインフルエンザウイルス1型

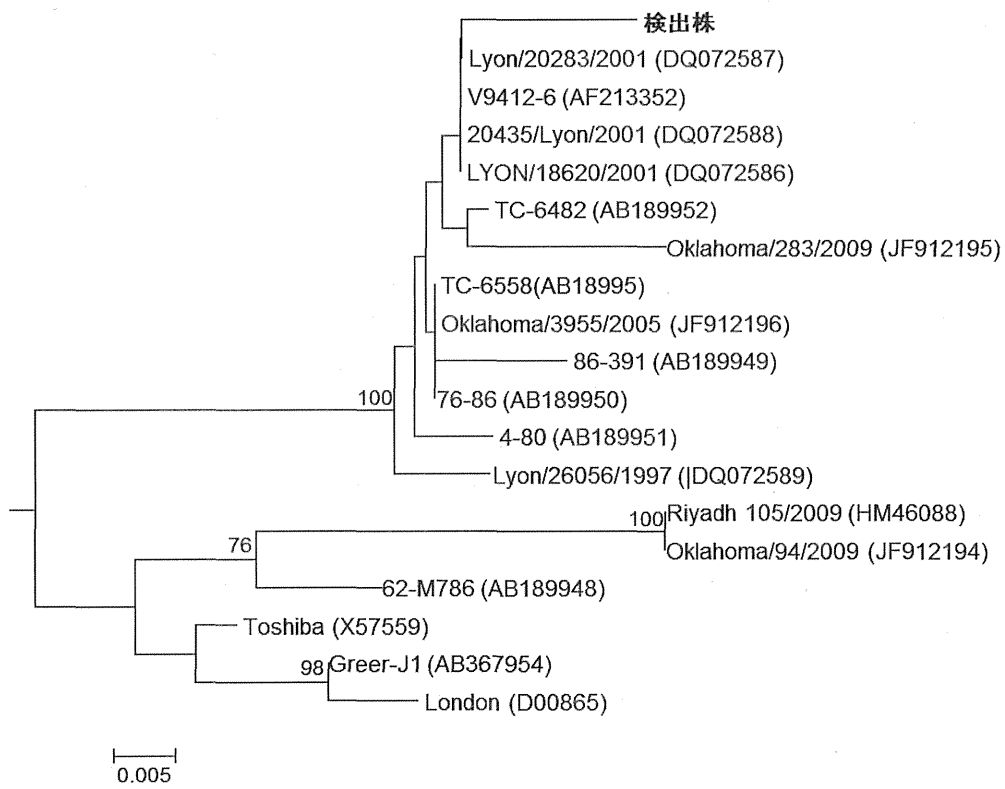


図2 脳症患者から検出されたパラインフルエンザウイルス2型

「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)

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)

研究要旨

ヒトの呼吸器感染症の原因ウイルスの一つである Human Parainfluenza virus(HPIV)には4つの型があり、その中の HPIV4 には2つのサブグループ(4a,4b)があるが1、2、3型に比べ患者情報の蓄積が少なく、遺伝子データベースへの全長配列の登録も少ない。当所で分離したウイルス株について全長配列を決定するため、次世代シーケンサー (NGS) を用いて 4a : 1 株、4b : 3 株の分離株についてゲノム遺伝子配列の決定を行った。しかし、4a で数カ所、4b については数 10 カ所 coverage が低い (100 以下) の部分があったため、その部分を補完するためにプライマーを設計し、サンガー法 (従来法) でも配列を決定した。NGS で決定した塩基配列とサンガー法で決定した配列を比較した結果、より正確な全長配列を決定するためには NGS のデータが必要だった。

A.研究目的

近年、感染症等原因不明疾患の検査法に、次世代シーケンサー(NGS)を用いて検体中に存在するすべての病原体を検出する方法が用いられるようになってきた。よって、通常の検査で何も病原体が検出されなければ、NGSを利用する使い方がメインであると考えられる。しかし、それだけではなく、NGSでは、短い配列を一度のRunで100~1500万リード読むことが出来るため、ウイルスゲノム遺伝子等の全長配列を一度のRunで決定することも出来る。

当所では不明疾患の原因検索だけでなく、検出数が少なく、また、データベース上に全長配

列の登録も少ないHPIV4の全長配列の解析を行うことを試みた。

B.研究方法

当所に搬入された病原体サーベイランスや調査研究用の検体から分離された HPIV4 の全長配列を決定するために、分離株 4a : 3 株、4b : 6 株のうち、4a : 1 株、4b : 3 株について解析を行った。これは NGS の技術習得を含め、国立感染症研究所での研修時に行った。解析の結果、coverage が低い (100 以下) 部分があり、それを補完するために、NGS により決定された配

列を基に PCR 用プライマーを作製した (表 1、2)。また、3'末端のリーダー配列と 5'末端のトレーラー配列部分 (図 1) については、4a は HPIV4\_DK(459)(KF483663)を基に (表 3)、4b は SKPIV4(EU627591)を基に作製した (表 4)。これらのプライマーを使用し、すべての株について、RT-PCR を行い、得られた amplicon について、ダイレクトシーケンスを行った。これにより得られた配列と NGS のデータを用い、CLC\_genomic\_workbench や Geneious で、NGS のデータのあるものは mapping を行い、また、無いものについては de novo assembly を行った。ウイルス RNA の抽出は、細胞培養上清から QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を Carrier RNA を添加せず使用し行った。RT-PCR には Primescript II High fidelity One step RT-PCR kit (TAKARA) を使用した。

### C. 研究結果

HPIV4a、HPIV4b 共に NGS で coverage の低い部分をサンガー法で補うことが出来た。また、NGS データが無い部分についても、サンガー法のデータからほぼ全長の配列を得られた。しかし、3'末端と 5'末端については他の部位に比べ重複して配列が得られた部分が少なく、プライマーの部分もあるため、完全な配列の決定には至らなかった。

### D. 考察及び結論

NGS データにサンガー法のデータを mapping し、coverage の低い部分を補うことが出来た。これにより、より正確性の高いデータを得ることが出来たと考えられる。しかし、NGS データに比べ、サンガー法で得られるデータは少ない。サンガー法では図 2 のような場合コンセンサス配列を得ることは難しい。しかし、同じ場所の NGS データ (図 3 枠内) を見ることで、たとえ、NGS データ全体でみ

ると coverage が低くリード数が十分でない部分であってもサンガー法に比べると、遙かに多くの情報をもっているため、正しい配列の決定が可能であり、変異の確認もできる。よって、サンガー法の配列データのための 4a : 2 株、4b : 3 株についても、より正確な配列を得るためには、NGS を行う必要があると考えられる。

### E. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

### F. 研究発表

1. Makoto Kuroda, Shoichi Niwa, Tsuyoshi Sekizuka, Hiroyuki Tsukagoshi, Masaru Yokoyama, Akihito Ryo, Hironori Sato, Naoko Kiyota, Masahiro Noda, Kunihisa Kozawa, Komei Shirabe, Takashi Kusaka, Naoki Shimojo, Shunji Hasegawa, Kazuko Sugai, Masatsugu Obuchi, Masato Tashiro, Kazunori Oishi, Haruyuki Ishii, and Hirokazu Kimura. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C, Scientific Reports, in press.

2. Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. Cytokine. 2014, Oct;69(2):206-10.

3. Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K. Comparison of Two

Methods of Bacterial DNA Extraction from Human Fecal Samples Contaminated with *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Campylobacter jejuni*. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):441-6.

G.知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

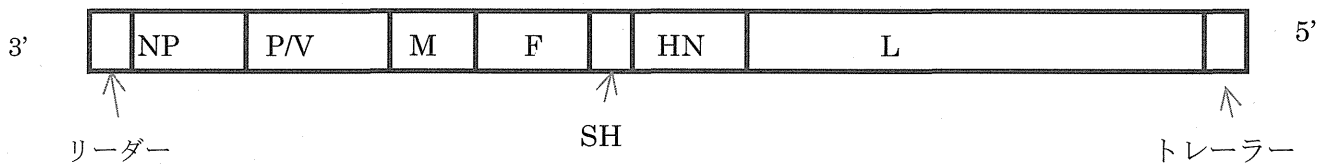


図1 HPIV4のゲノム構造

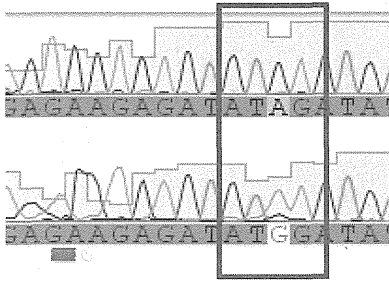


図2 サンガー法のデータ

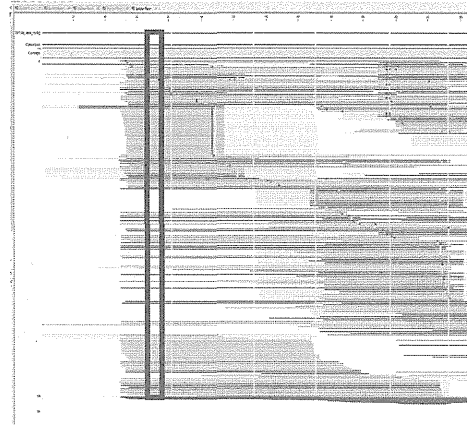


図3 NGSデータ

表 1 HPIV4a PCR 用 Primer

| Name                  | Sequence                   | Size  |
|-----------------------|----------------------------|-------|
| PCR-F-primer(102-F)   | TCCTRAGTTAACAATCAATCCGGACC | 4,443 |
| PCR-R-primer(4544-R)  | AGTTGTTTTGCCATTGTAGGAGATGC |       |
| PCR-F-primer(4451-F)  | GGAAAATCCCAAAGTCTGCCAGCC   | 4,832 |
| PCR-R-primer(9282-R)  | AAACGGGTTGATCTGAAAGTCCCC   |       |
| PCR-F-primer(9030-F)  | TGCATTCCCACTTGAAACGAGCG    | 4,871 |
| PCR-R-primer(13900-R) | ACGCGTGTCTTAGAAAAGTTCGTACG |       |
| PCR-F-primer(13533-F) | TGGGCTCCTTTRTTGCATGGTAGGGG | 3,233 |
| PCR-R-primer(16765-R) | TGTATTCCGACAAARAGAGTGCAACC |       |

表 2 HPIV4b PCR 用 Primer

| Name                  | Sequence                    | size |
|-----------------------|-----------------------------|------|
| PCR-F-primer(153-F)   | TCACCATGTCTTCGGTTTTAGCTGC   | 4331 |
| PCR-R-primer(4483-R)  | TGAAATAGAGGCTGGCAGATTTGGGG  |      |
| PCR-F-primer(4404-F)  | AGGTATCAGTGATCTATGGGGGCC    | 4838 |
| PCR-R-primer(9241-R)  | TCACCCACCTCAAGTATGTAAAGGC   |      |
| PCR-F-primer(8939-F)  | AGATTGCCCRGGAAATAAAGCTTGCCC | 4853 |
| PCR-R-primer(13791-R) | TGAGAAGCACCTGGTATTTGGGCC    |      |
| PCR-F-primer(13527-F) | GGGCTCCTTTGTTACATGGTAGGGG   | 3639 |
| PCR-R-primer(17165-R) | TGGTGTGGCCTTAGTCCTCTTATCC   |      |

表 3 HPIV4a PCR 用 Primer (3',5')

| Name               | Sequence                 | Size |
|--------------------|--------------------------|------|
| 4a-DA_HPIV4c_21F_C | ACCAAGGGGAGAAGAGATA      | 376  |
| 4a-DA_HPIV4c_25R   | TAATGCCCTTGCTTAATCG      |      |
| 4a-DA_HPIV4c_24F_C | CCAAGGGGAGAAGAGATATRGA   | 567  |
| 4a-DA_HPIV4c_27R   | CAAATCCCTGGCTAATGCTC     |      |
| 4a-DA_HPIV4c_37F   | TGGGAACAATTAATCCGTCAG    | 682  |
| 4a-DA_HPIV4c_38R_C | CGTTTGMATCATTRAAYTGG     |      |
| 4a-DA_HPIV4c_38F   | GGTTGCACTCTTTGTCGGA      | 362  |
| 4a-DA_HPIV4c_39R_C | ACCAAGGGGAGAAKAGATAWGAAA |      |

表 4 HPIV4b PCR 用 Primer (3',5')

| Name                | Sequence                 | size |
|---------------------|--------------------------|------|
| 4b-DA_HPIV4c_21F-C  | ACCAAGGGGAGAAGAGATA      | 376  |
| 4b-DA_HPIV4c_25Re   | TAAYGCTCCCTGTTTGATTG     |      |
| 4b-DA_HPIV4c_24F-C  | CCAAGGGGAGAAGAGATATRGA   | 567  |
| 4b-DA_HPIV4c_27Re   | CAAATCTCTRGATAATGCCC     |      |
| 4b-DA_HPIV4c_37Fe   | TGGGAACAATTAATACAYCAA    | 682  |
| 4b-DA_HPIV4c_38Re_C | CGTTTGAATCRITRAACTGG     |      |
| 4b-DA_HPIV4c_38Fe   | GGATGTACYCTYTTTCGTTGGA   | 632  |
| 4b-DA_HPIV4c_39Re   | ACCAAGGGGAGAATAGATAAGAAA |      |

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、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：地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用について、昨年度に引き続き、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、無菌性髄膜炎、脳炎・脳症患者の検体からは病因と推定される病原体の遺伝子は検出されなかった。一方、昨年度の調査で感染性胃腸炎集団事例から見つかったサポウイルス GV.2 について、PCR 法により本ウイルスが当該事例の原因ウイルスであることが確かめられた。また、少量の便検体からは解析リードは得られなかったものの、便検体自体のメタゲノム解析は十分可能であることが示唆された。これらのことから、地方衛生研究所での病原体診断に次世代シーケンサが応用可能であることが示されたので、今後さらに検体を解析していくことで次世代シーケンサの利用方法や解析方法を確立するとともに、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構築についてもさらに検討していきたい。

#### A. 研究目的

地方衛生研究所では、感染症発生動向調査や集団食中毒事例等の行政依頼検査において、臨床ないし食品等の検体で病原体診断を行っている。しかし、検出感度が高い PCR 法などによる病原体遺伝子診断を行っても全ての検体の検査が陽性になるわけではない。一方、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。そこで、地方衛生研究所における次世代シーケンサの応用を検討するため、以下の 3 項目につ

いて研究を行った。

- 1) 原因の特定されないウイルス感染症の網羅的ウイルス検索：昨年度に引き続き、無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の診断名で当ウイルス部に搬入され、検査した結果、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。
- 2) 胃腸炎集団事例からのサポウイルス遺伝子型 GV.2 の検出：昨年度に報告を行った通り、行政検査によりウイルスが検出されなかった胃腸炎集団事例 1 事例の 6 検体の患者便について次世代シーケンサによる



メタゲノム解析を行ったところ、3 検体より 2~6 リードのサポウイルス (SaV) が検出され、いずれのリードも、食中毒事例 (2012 年 5 月、名古屋市) から検出されたサポウイルス (Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN(AB775659) : SaV GV.2) のゲノムの塩基配列の一部と 93~99% 一致した。Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN 株はリアルタイム PCR 法 (Oka T, et al., J Med Virol 78: 1347-1353, 2006) やコンベンショナル PCR 法のプライマーと相同性が低いことが確認されたため、本事例の SaV においても、プライマーとの相同性が低いために行政検査のリアルタイム PCR 法で検出されなかった可能性が考えられた。そこで、本年度は、SaV GV.2 に特異的なプライマーを作成し、本事例の検体からウイルス検出を試みた。

また、SaV GV.2 は過去に当ウイルス部で検査を行った胃腸炎検体からは検出されていないものの、従来の検査法では感度が低いため探知されていない可能性があった。そこで、過去のウイルス非検出の胃腸炎事例についても、SaV GV.2 の検出を試みた。

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、検体にはさまざまな制約があることがほとんどである。従って、検体が少量しか得られない場合が想定されるため、このような検体で検査が可能かどうか検討した。

## B. 研究方法

1) 無菌性髄膜炎、脳炎・脳症が疑われ、

当ウイルス部に 2008 年から 2012 年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。昨年度は、無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の髄液検体のみを検査したため、本年度は、髄液以外の検体を検索することとし、無菌性髄膜炎症例の咽頭拭い液 6 検体、便 1 検体、及び脳炎・脳症症例の咽頭拭い液 1 検体、便 1 検体、血清 3 検体を検査した。これらの症例は、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、及び 5 種類の培養細胞 (Vero、MA104、RD-18S、HEp-2、Caco-2) を用いた分離培養検査でウイルスが検出されなかったものである。

RNA ライブラリの作製、及びシーケンスは昨年度と同様に行った。即ち、キャリア RNA (poly A) 無添加 Buffer AVL を用いた RNA 抽出キット (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN) により、検体から RNA を抽出した。次いで、ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation kit (Epicentre)、ScriptSeq Index PCR Primers Set (Epicentre)、及び FailSafe PCR Enzyme (Epicentre) を用いて RNASeq ライブラリを作製した。作製した RNASeq ライブラリは、AMPure XP Purification (Beckman coulter) により精製した。DNA 濃度をランあたり約 11pM となるように希釈し、MiSeq Reagent kit micro 300 Cycles PE (Illumina) を用いて解析した。

Miseq により解読した塩基配列は、CLC Genomics Workbench (Filgen) により総リ

ード数を求め、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの MePIC ソフト (Takeuchi,F., et al. Jpn.J.Infect.Dis., 2014, 67:62) を用いてヒトゲノム配列の除去と megablast 検索を行った。MePIC により分類された塩基配列は、MEGAN4 (Universität Tübingen) を用いて閲覧した。

2) コンベンショナル PCR 法を用いた SaV GV.2 の検出には、昨年度の報告で次世代シーケンサによるメタゲノム解析を行った胃腸炎集団事例 1 事例 (2013 年 4 月発生) の患者便 10% 乳剤 6 検体を用いた。

ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) に記載された SaV 遺伝子増幅用プライマー (SV-F11/SV-R1 及び SV-F2/SV-R2) のうち、Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN と塩基配列の不一致がみられたプライマー SV-F11、SV-R1、SV-R2 を元に、塩基配列をこの株の塩基配列に改変したプライマー SV-F11\_NGY-1、SV-R1\_NGY-1、SV-R2\_NGY-1 (表 1) を作成した。検体は、厚生労働省通知 (食安監発 1105001 号) に基づき RNA を抽出し、DNase 処理、逆転写反応を行った後、SV-F11\_NGY-1/SV-R1\_NGY-1 及び SV-F2/SV-R2\_NGY-1 による nested PCR 法を実施した。

さらに、富山県衛生研究所で 2010 年度～2013 年度に受け付けた胃腸炎症例のうち、病原ウイルスが特定されなかった集団事例 13 事例、散发例 33 症例の便検体について、方法 1 と同様に SaV GV.2 特異的プライマーを用いた PCR 法による検出を試みた。

3) 利用した便検体は、食中毒関連で収集

した便検体 16 検体 (連結不可能匿名化処理済) である。そのうち、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 DNA の抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Inc) を用いた。抽出した DNA の濃度測定は、NanoDrop および Qubit を用いた。次世代シーケンサ解析用 DNA ライブラリの作製には、NexteraXT ライブラリーキットを使用した。作製は、製品キットのプロトコール通りに実施した。また、MiSeq による解析は、MiSeq Reagent Kit V3 600PE を用いて、fastq 形式で結果を保存した。

MiSeq でえられた配列から、ヒト由来配列の削除は、MePIC を用いた。また、MePIC の解析で出力されたヒト配列以外の配列リードの Blast 検索結果は、Windows 環境の MEGAN5 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan5>) に、インポートして利用した。

(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) 次世代シーケンサー Miseq によるリード数は、無菌性髄膜炎では 1 検体あたり 48,988～286,498 リード (平均 167,411)、脳炎・脳症例では 1 検体あたり 151,342～770,374 リード (平均 322,485) であった (表 2)。MiSeq Reagent kit micro 300

Cycles PE (Illumina)を用いたため、同 nano kit を用いた昨年度より 1 検体あたりの解析リード数が一桁上がり平均十萬リードを越えた。

上記の塩基配列を megablast 検索したところ、ウイルス類似配列が 1 検体あたり 22~1,466 リード認められ、MePIC リード数の 0.04~1.8%を占めた (表 2)。それらはライブラリ作製キットの逆転写酵素に由来するレトロウイルス遺伝子類似配列、腸内細菌叢由来のバクテリオファージ、植物由来ウイルス等と考えられ、病因と推定される病原体の遺伝子は含まれていなかった。細菌リード数は 1 検体あたり 549~202,313 リード認められ、MePIC リード数の 5.0~42.8%を占めた (表 2)。多くはヒトへの病原性の報告がない由来不明の細菌と推定された。細菌リード数の割合は血清で低く (平均 9.8%)、便 (同 37.0%) 咽頭拭い液 (同 28.3%) で高かった。しかしながら、それは昨年度行った髄液で最も高く、平均 78.5%だった。

2) PCR 法を実施した結果、6 検体全てにおいて 1st PCR、nested PCR 共にバンドが得られた (図 1)。ダイレクトシーケンス法により検出された SV-F2/SV-R2\_NGY-1 領域の配列は、患者 6 検体で 100%一致し、Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN と 99.8% (410/411 塩基) 一致した。よって、本事例の原因ウイルスは SaV GV.2 と特定された。

過去 4 年間の病原体未特定の胃腸炎集団事例 13 事例、散発例 33 症例の検体について、PCR 法により SaV GV.2 検出を試みた

ものの、いずれの検体からも SaV GV.2 は検出されなかった。

3) 昨年度、16 検体の便検体 DNA を抽出し、Nextera XT DNA ライブラリ作製キットを用いて DNA ライブラリを作製したことを報告した。このうち 8 検体は、Cary-Blair 便検体である。作製したライブラリの一部を用いて、確認したところ、ライブラリが作製されていた (図 2、昨年度の再掲)。

これらの DNA ライブラリを MiSeq で解析したところ、Cary-Blair 検体からのサンプルでは解析リードが全く得られなかった。MiSeq で結果が得られた便検体からは、最小で 1,281,985、最大で 4,938,934 リードが得られ、MePIC によるヒト配列を削除した後の残ったリードの割合も最小で 26.1%、最大で 96.5%と検体によって差があった。

また、この MePIC 処理後の配列リードから、腸管出血性大腸菌の感染の証拠のひとつとして、大腸菌のファージ配列を指標となるか検討した。MEGAN5 にインポートしたデータから、大腸菌ファージのリードは、MiSeq で解析が成功した 8 検体のうち、5 検体から検出され、ヒト以外の配列に対するリード数の割合は、最小で 0.002%、最大で 0.12%であった。(表 3)

#### D. 考察

無菌性髄膜炎、脳炎・脳症の検体として、髄液、咽頭拭い液、血清、便などが検査対象になるが、病原微生物により同定される検体の種類が異なることが予想される。検体の種類により検出される細菌リード数の割合が異なる傾向を示したように、各検体に含まれる微生物の数、種類にそれぞれ特徴があると推定される。病原体を同定する

ためには、解析数を増やし、各種検体の背景として検出される微生物叢の特徴を把握する必要があると考えられる。

本研究でコンベンショナル PCR 法により SaV GV.2 が検出された 6 検体のうち 3 検体は、昨年度の次世代シーケンサによる解析では SaV GV.2 のリードが検出されなかった。よって、検体から確実に病原体を検出するためには、設定リード数をより増やす必要があることが改めて確認された。本事例のように、既知のプライマーとの相同性が低く検出できない病原体や、集団感染が疑われる事例における病原体の検索には、特異的プライマーに依存しない次世代シーケンサによるメタゲノム解析は有用であると考えられた。本事例の原因ウイルスと特定された SaV GV.2 は、2010 年度～2013 年度の胃腸炎症例からは検出されなかったため、本事例の発生した 2013 年 4 月以前にこのウイルスが富山県内で流行していた可能性は低いと考えられた。

原因菌が検出されない食中毒や感染症事例を次世代シーケンサで解析する場合、①検体からの DNA あるいは RNA の抽出、②次世代シーケンサで解析するための DNA ライブラリの作製と次世代シーケンサによる解析、③データ解析の 3 つの工程で実施される。昨年度は、①について、検体の状態に依存することが充分予想されることから、腸管出血性大腸菌 (EHEC) による集団食中毒事例で収集した便検体及び少量便検体として Cary-Blair 培地入り便検体を対象とし、DNA ライブラリの作製を試みた。今年度は、先の工程の②及び③について検討した。今回の DNA ライブラリの作製は、MiSeq で解析するための標準的な試薬キッ

トを用いたが、Cary-Blair 培地の便検体からはまったく MiSeq による解析ができなかった。この理由は、Cary-Blair 培地内の実質の便検体が少ないため、解析対象の検体としては不適なのかもしれない。実際の食中毒事例では、急性期の便検体は、診断目的で採取されることがあるため、これを検体として用いることで、MiSeq によるメタゲノム解析は今回の検討でも可能であることは確認することはできた。

また、MePIC 処理後のリードの解析から、今回は、大腸菌ファージに関連する割合を検討した。メタ解析の場合、検体により、解析対象のリード数は変動することが容易に予想されるが、同じ集団事例での複数の検体を用いたこの実際の変動の情報については、ほとんどデータが存在しないので、今回のデータは貴重なデータであると思われる。今回、使用した便検体は、EHEC による集団食中毒事例で収集した便検体である。EHEC の重要な病原因子であるベロ毒素は、ファージゲノム中に組み込まれているが、しばしば起因菌が検出できないことがある。そのような場合の検査にファージ配列を対象にした診断法の開発につながることを期待される。今後は、ファージの宿主である大腸菌由来のリード数等の検討を加え、食中毒事例の便検体を用いたメタゲノム解析の有用性を評価したい。

## 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、既知のプライマー配列とは異なる SaV が感染性胃腸炎集団事例の原因ウイルスであることが判明した。また、少量の便検体ではリードは得ら

れなかったが、便検体自体はメタゲノム解析ができることもわかった。これらのことから、地方衛生研究所での病原体診断に次世代シーケンサーが応用可能であることが示されたので、その利用方法や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構築をさらに検討したい。

#### 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) 稲崎倫子、名古屋真弓、板持雅恵、嶋一世、小渕正次、稲畑良、長谷川澄代、黒田誠、佐多徹太郎、滝澤剛則. 次世代シーケンサーによる感染性胃腸炎集団事例患者検体からのサポウイルス GV.2 の検出. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

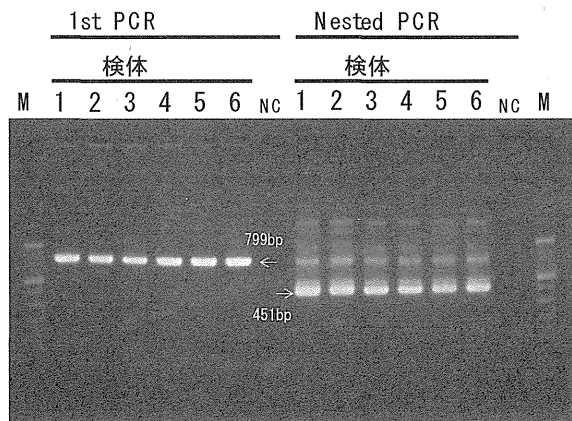
なし

表 1. SaV GV.2 特異的プライマー

| プライマー        | Sequence (5' - 3')     | 極性 | SaV GV.2(AB775659)設定位置 |
|--------------|------------------------|----|------------------------|
| SV-F11_NGY-1 | AGCTGGTACATAGGAGGCAC   | +  | 5093-5112              |
| SV-R1_NGY-1  | ATGGAGATGTGCCGTTATCCAT | -  | 5891-5870              |
| SV-R2_NGY-1  | GTGGGATTAECTCCAGGAGG   | -  | 5604-5585              |

表 2. 脳炎・脳症及び無菌性髄膜炎例検体の遺伝子解析結果

| 検体            | 総リード数  | MePIC<br>リード数 | 細菌<br>リード数 | 細菌<br>リード数<br>の割合 | ウイルス<br>リード数 | ウイルス<br>リード数<br>の割合 |
|---------------|--------|---------------|------------|-------------------|--------------|---------------------|
| 脳炎・脳症(血清)     | 48988  | 4239          | 707        | 16.7              | 22           | 0.5                 |
| 脳炎・脳症(血清)     | 212092 | 14305         | 1091       | 7.6               | 24           | 0.2                 |
| 脳炎・脳症(咽頭拭い液)  | 140338 | 46064         | 19695      | 42.8              | 118          | 0.3                 |
| 脳炎・脳症(便)      | 286498 | 38260         | 14513      | 37.9              | 25           | 0.1                 |
| 脳炎・脳症(血清)     | 149138 | 11022         | 549        | 5.0               | 30           | 0.3                 |
| 平均            | 167411 | 22778         | 7311       | 32.1              | 44           | 0.2                 |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 230952 | 68680         | 17450      | 25.4              | 1216         | 1.8                 |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 151342 | 21079         | 3916       | 18.6              | 129          | 0.6                 |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 285324 | 51480         | 11192      | 21.7              | 328          | 0.6                 |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 217594 | 33661         | 9616       | 28.6              | 156          | 0.5                 |
| 無菌性髄膜炎(便)     | 322854 | 87508         | 31555      | 36.1              | 32           | 0.04                |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 278956 | 111381        | 24402      | 21.9              | 522          | 0.5                 |
| 無菌性髄膜炎(咽頭拭い液) | 770374 | 516536        | 202313     | 39.2              | 1466         | 0.3                 |
| 平均            | 322485 | 127189        | 42921      | 33.7              | 550          | 0.4                 |



2%Agarose S gel

M : 100bp DNA Ladder

図 1. SaV GV.2 特異的コンベンショナル PCR 法により得られた電気泳動像

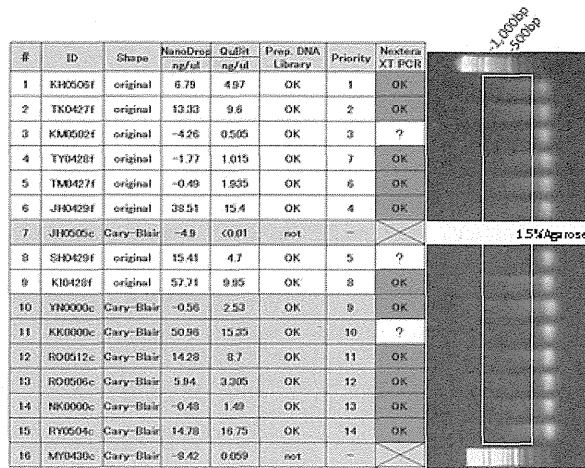


図 2. 便 DNA の定量と NexteraXT によるライブラリの検定

表 3. 腸管出血性大腸菌食中毒事例で回収された便検体 DNA のメタゲノム解析結果

|    | Specimenshape | Read total : | Read No. after MePIC (%) | Detection of E.coli phage reads (%) |
|----|---------------|--------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 1  | original      | 4,938,934    | 1,289,711 (26.1%)        | 0                                   |
| 2  | original      | 4,564,676    | 1,612,604 (35.3%)        | 110 (0.002%)                        |
| 3  | original      | 1,281,985    | 1,185,973 (92.5%)        | 0                                   |
| 4  | original      | 2,074,990    | 2,001,928 (96.5%)        | 2697 (0.12%)                        |
| 5  | original      | 3,382,033    | 1,821,068 (53.8%)        | 746 (0.02%)                         |
| 6  | original      | 2,538,991    | 857,491 (33.8%)          | 99 (0.004%)                         |
| 7  | Cary-Blair    | -            | -                        | -                                   |
| 8  | original      | 2,152,254    | 1,274,169 (59.2%)        | 0                                   |
| 9  | original      | 4,768,236    | 2,864,714 (60.1%)        | 141 (0.003%)                        |
| 10 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |
| 11 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |
| 12 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |
| 13 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |
| 14 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |
| 15 | Cary-Blair    | -            | Not detected             | -                                   |

「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の間に構築した病原体の次世代シーケンサー (NGS) による網羅的解析を行うネットワークにより、原因不明の集団食中毒疑い事例を対象に、NGS を用いて病原体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。

A. 研究目的

感染症や食中毒の病原体遺伝子を検索する場合、現在は、PCR 法が広く用いられている。PCR 法は、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とする場合には複数の反応を同時に実施する必要がある。

一方、最近開発された次世代シーケンサー (NGS) による解析は、遺伝子を網羅的に解析することが可能であることから、不特定の病原体を一度に検索することが可能である。

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が、感染症疑い症例や食中毒疑い症例を対象に病原体の網羅

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、昨年度、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を構築した。

今年度は、構築したネットワークにより通常の微生物検査で原因が特定されなかった集団食中毒疑い事例を対象に感染研 病原体ゲノム解析研究センターと連携して NGS による病原体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疑い事例

テニス大会に参加するため岩手県内の某ホテルに宿泊した 8 つの学校の生徒・職員が腹痛・下痢・発熱等の食中毒様症状を呈した事例を対象とした。通常の微生物検査



では原因が特定されなかった事例である。

#### (1) 発生状況

・患者の発生は平成 26 年 9 月 26 日から 30 日。図に日時別患者発生状況を示したが、発生パターンは一峰性であった。

・主症状は腹痛（発現率 82.4%）、下痢（67.6%）、発熱（35.3%）（37.8～39.0℃）、嘔気（32.4%）、嘔吐（17.6%）。

・患者数は、9 月 25 日から 28 日の間に当該ホテルを利用した 9 つの学校の生徒・職員 145 名うち 8 つの学校の 34 名。11 名は通院治療を受けた。

・食品提供施設は当該ホテル

・原因食品は不明

・病因物質は不明

#### (2) 原因調査

調理従事者及び患者の糞便を対象として、細菌検査では菌分離を、ウイルス検査では PCR 法による遺伝子検出を行った。

検査項目は、細菌検査は、病原大腸菌、ウェルシュ菌、サルモネラ、カンピロバクター、セレウス菌、プレシオモナス、エルシニア。ウイルス検査はノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス。

検査の結果、細菌検査では患者 2 名から病原性大腸菌が、従業員 1 名からウェルシュ菌が検出されたが、その他の菌種は陰性であった。ウイルス検査では、全ての項目で陰性であった。

#### (3) 喫食状況調査

患者に共通する飲食物は、当該ホテルが提供した食事のみであった。

## 2. 材料

3 つの学校の 8 名の患者の糞便を検査材料とした。

## 3. 遺伝子の網羅的解析

感染研において次の方法により NGS

(MiSeq, Illumina) を用いて病原体遺伝子

の網羅的解析を行った。

材料 0.05 g から Total nucleic acid

preparation kit (Ambion) にて

DNA/RNA を抽出し、抽出した RNA から

ScriptSeq v2 RNA-seq library

preparation kit にて 解読用の cDNA ライ

ブラリーを作成した。アガロース電気泳動

にて増幅産物の確認を行い、同時に 250

bp~500 bp の DNA 断片を含むアガロース

ゲルを回収し精製した。検体の DNA 濃度

が全ての検体で同じになるよう調整した後、

検体を混合し、NGS 用解読試料とした。

MiSeq (Illumina) により遺伝子解析を実

施した。解読の進捗状況を精査するため、

配列データを BaseSpace (Illumina) にて

確認し、ヒトゲノム削除・病原体検索を

MePIC 2 (感染研サーバー) で解析した。

病原体検索は、MEGABLAST 検索による

核酸配列の照合及び RAPsearch2 検索による

アミノ酸配列の照合を行った。MePIC2

から得られた検索データをダウンロードし、

MEGAN v5 (チュービンゲン大学) により

類似性の得られた生物種を系統樹として表

記して不明症例に該当する病原体の探索を

行った。

#### (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。①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。②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。③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ている。

### C. 研究結果

表に網羅的解析により得られた総リード数、総リード数からヒトゲノム由来のリードを削除した後に残ったリード数と残ったリード数の総リード数に対する割合及び MEGABLAST 解析を行ったリード数を示した。各検体とも解析に十分なリード数が得られた。総リード数からヒトゲノム由来のリードを削除した後に残ったリード数の割合は 92.8%~97.8%と各検体とも高い値であった。つまり、ヒト配列が想定以上に少なかったことから、腸管粘膜の剥離を伴わない下痢症であったことが推察された。MEGABLAST 解析では、 $1.4 \times 10^5 \sim 9.7 \times 10^5$  リードと各検体とも多数のリードについて解析を行ったが、いずれの検体からも新たな病原体は検出されなかった。

### D. 考察

集団食中毒が疑われたが通常の微生物検査では病原体が検出されなかった事例を対象に NGS により病原体遺伝子の網羅的解析を行ったが、新たな病原体は検出されなかった。今回の解析では、得られたリードからヒトゲノム由来のリードを除去した後に残ったリードの割合が全ての検体で 90%以上と高率であった。このことは、患者の消化管に病原体は感染していなかったため糞便中の消化管粘膜細胞数が少なかったことによると推察され、原因は感染性の病原

体ではない可能性が示唆された。

また、網羅的解析で新たな病原体が検出されなかったことから、今回の解析は、岩手県環境保健研究センターで行った通常検査の検査精度が保たれていたことを確認する機会となった。

### E. 結論

感染研との間に構築した病原体の網羅的解析を行うネットワークにより、原因不明の食中毒疑い事例を対象に NGS による病原体の網羅的解析を実施した。解析により、新たな病原体は検出されなかったが、対象とした事例の原因は病原体ではない可能性を示唆する有益な結果が得られた。

今後はさらに解析事例を増やすとともに感染症や食中毒の発生時の微生物検査における NGS による病原体の網羅的解析の位置づけについて、経費や迅速性の面から検討が必要と考えられた。

### 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

図 患者の日時別発生状況

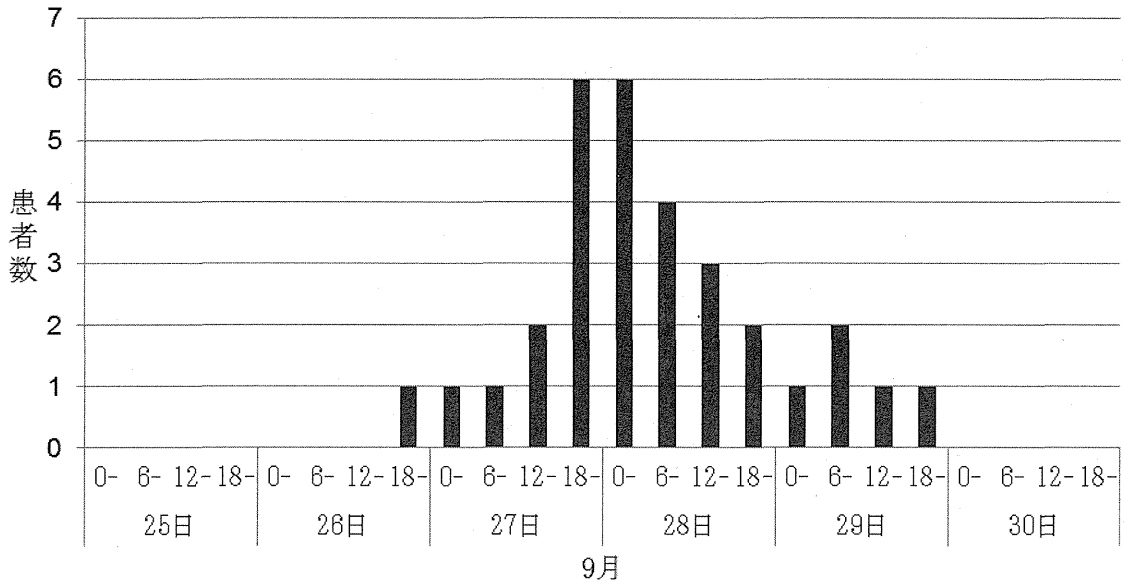


表 解析結果

| 検体番号       | 総リード数     | ヒトゲノム由来リード除去により |       | MEGA BLAST 解析<br>リード数 |
|------------|-----------|-----------------|-------|-----------------------|
|            |           | 残ったリード数         | 割合    |                       |
| OB14-43-1  | 2,568,180 | 2,448,236       | 95.3% | 949,767               |
| OB14-43-2  | 2,229,044 | 2,129,225       | 95.5% | 941,691               |
| OB14-43-3  | 1,309,148 | 1,252,659       | 95.7% | 953,607               |
| OB14-44-11 | 1,925,830 | 1,836,145       | 95.3% | 950,151               |
| OB14-44-12 | 944,370   | 876,041         | 92.8% | 834,734               |
| OB14-44-13 | 2,314,641 | 2,160,467       | 93.3% | 957,701               |
| OB14-45-1  | 1,105,292 | 1,081,219       | 97.8% | 971,682               |
| OB14-45-2  | 225,844   | 218,632         | 96.8% | 141,070               |

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 氏名 舘田 一博 (所属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
研究協力者 氏名 青木弘太郎 (所属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
嵯峨 知生 (所属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
石井 良和 (所属) 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

### 研究要旨

抗菌薬の先行投与が原因で培養が陰性となり、原因菌が特定出来ず抗菌薬の選択に苦慮するケースがある。我々は、化膿性椎体炎の椎体穿刺吸引物、感染性心内膜炎の疣贅および脳膿瘍ドレナージの膿汁について、それぞれ次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索 (DNA-seq) に供試し、原因微生物を特定し得た。脳膿瘍では混合感染を示唆する結果が得られ、病原体網羅的検索の優位性が示された。これらの結果の結果を踏まえて、臨床では抗菌薬が適切に選択された。さらに、通常検査法では病原体の特定ができないことが多い、ウイルス性髄膜炎および脳炎が疑われた患者血清を用いて核酸の網羅的検索 (RNA-seq) を実施した結果、臨床像から疑われていたウイルスに由来する遺伝子を検出するに至った。

### A. 研究目的

感染症診療において適切な検査による原因微生物の特定は、治療薬を選択する上でも必要不可欠である。重症度が高いあるいは治療薬に反応しない、または長期間の治療を要する感染症において、原因微生物の同定は特に重要である。しかし感染症診療において、従来の検査法では感染症の原因微生物を特定することができない症例に遭遇することがある。このような場合、病原体に由来する遺伝子を検出することで起因微生物を推定することが可能な場合がある。従来法で診断できない起因微生物を推定することは、感染症患者にもたらす治療上の有益性はきわめて大きいと考えられる。

我々は、通常微生物検査で原因病原体が不明となってしまった症例について、感染症の起因病原体を特定することを目的に次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索 (DNA-seq および RNA-seq) を行なった。

### B. 研究方法

各種臨床検体から全核酸 (DNA および RNA) を抽出し、臨床像から細菌をターゲットとした場合には DNA-seq を、RNA ウイルスをターゲットとした場合には RNA-seq を実施した。DNA ライブラリの調整には Nextera XT DNA Sample Prep kit (illumina) を、RNA (cDNA) ライブラリの調整には ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation Kit (epicentre) を用いた。各ライブラリの解読には次世代 DNA シークエンサー MiSeq (illumina) を用い 250bp×2 でシークエンスを行なった。取得したリードの解析には、メタゲノム病原体検索ツールである MePIC (国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター) を用いた。検索結果を MEGAN にて閲覧し、結果の解釈および討論を実施した。

### 倫理面への配慮

「微生物の網羅的検出法を用いた原因病原体の検索」は、東邦大学医学部倫理委員会から平成 25 年 12 月 19 日付で承認を受けている (課題番号: 2510924060)。

本検査でも申請書に記載した通り、次世