

平成 26 年度 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
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

総括研究報告書

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

研究代表者 黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）
研究協力者 関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）
竹内史比古（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・室長）
山下明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

未知病原体や変異病原体による感染症疑いの不明症例の解明や、新興感染症の汎発流行に對し
的確な対処法を立案・整備する上で、次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA
sequencer: NGS）による網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの一つと考
えている。本計画は、臨床検体から網羅的に病原体を検出する次世代型病原体検査法へと発展さ
せ、原因不明症例を不明のまま残さない抜本的な検査法の改革に貢献するのが目的である。現在、
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで行政検査・依頼検査を遂行中であるが、こ
れら技術を普及させるべく、迅速な現場対応を可能とする地研・大学病院との感染症対策ネット
ワークの構築を目指す研究班である。

本年度は研究代表者として大学病院・地研でも次世代型検査法が運用可能になるよう、引き続
き感染研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サー
バーMePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) を運用
し、NGS を有する研究分担者（地研・大学病院）の不明症例解析をサポートした。各分担研究者
の成績から、群馬県衛生環境研究所では急性膝（HHV-6）、脳症（HPIV-2）エンテロウイルス流行
期（HPIV1, CoxA6）、山口県環境保健センターでは呼吸器感染症で頻出する HPIV-4 の全ゲノム解
読、富山県衛生研究所では集団食中毒下痢症（サボウイルス：2012 年名古屋・集団食中毒と同
等の塩基配列）、東邦大学・医学部では感染性心内膜炎、脳膿瘍 (Aggregatibacter, Fusobacterium
の混合感染)、脳炎疑い (Human parechovirus 3)、感染研・感染病理部では不明心筋炎
(trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus.) の病原体特定を遂行した。地研で収
集した咽頭拭い液検体から、培養細胞による分離が難しい Human rhinovirus C (HRV-C)陽性検
体を選別し、NGS によるハイスループット・ゲノム解読法を開発して計 139 株の HRV-C 表層抗原
VP1-3 の配列情報を決定した。得られた配列情報の進化分子系統関係と表層抗原の構造シミュレ
ーションの結果、HRV-C は 4 つの Lineage に分岐し、表層 VP1-3 は多様なアミノ酸置換を伴う抗
原性を示しながらも免疫による Positive selection を受けていない可能性が示唆された。

不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・
技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。本年度明らかになったネットワーク
の効率が悪い律速段階に情報転送網の不備が見つかり、解読データをより迅速に転送するシステ
ム整備が不可欠であることが判明した。また、NGS 検査のみでは解決できない不明症例も散見さ
れることから、抗体検査も視野に入れた総合的な不明症例対策も試みる予定である。臨機応変か
つ重点的に問題解決に向けエフォートを投じ、従来のレファレンス活動をより重厚なシステムへ
と補強していきたい。今後さらに感染研と地研との連携ネットワークを発展させ、迅速に病原体
検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

研究分担者：

木村博一	国立感染症研究所・感染症疫学センター
小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所
調 恒明	山口県環境保健センター
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
齋藤幸一	岩手県環境保健研究センター
舘田一博	東邦大学・医学部・微生物・感染症学
片野晴隆	国立感染症研究所・感染病理部
梁明秀	横浜市立大学・医学部・微生物学

A. 研究目的

感染症疑いのある不明症例・バイオテロ・新興再興感染症などアウトブレイク対策のための迅速・網羅病原体解析法を基盤とした感染症対策ネットワークシステムの構築を行う。NGS(図1流れ図参照)は大量の核酸配列を偏見無く網羅的に解読することができ、本計画には必要不可欠である。解読の結果、従来法で特定できない易変異性 RNA ウィルスも“塩基配列”として確定することができる。地方衛生研究所(地研)における感染症発生動向調査においても、重症あるいは原因不明感染症由来の病原体網羅解析のニーズは極めて高く、1次スクリーニングとして臨床検体からダイレクトに解読検査し、患者に生じている実像を把握することは早期解決への極めて有効な手段と考えられる。

感染研では、NGSの解析パイプラインを整備し、不明症例について病原体候補の特定に役立ててきた(養殖ヒラメ・0111・新規サポウイルスによる集団食中毒、ワクチン接種後の脳炎)。しかしながら、網羅配列解読法は認知されつつあるが先端的すぎるために、結果の解釈と情報処理に困難を伴う場合も少なくない。また、地研との物理的な距離、諸手続き等による遅延が生じ、有効な解析法であっても迅速性を発揮できない。

病原体の網羅的 PCR 検査法は開発されているが、未知・易変異性ウィルス等では同定不能になる事例が少ない無い。それを補うための NGS による“迅速性”と“包括性”を地研および基幹病院などの検査・医療現場に提供することを重視し、3カ年計画で地方衛生研究所と基幹病院と感染研との相互連携ネットワークの整備を重点的に行う。不明症例を迅速に究明するセーフティーネットとして、わが国における包括的な感染症対策に貢献することを目指す。

B. 研究方法

1. 感染症発生動向調査および食中毒事例において、迅速かつ網羅解析が必要な検体の収集および地研間の網羅解析ネットワークの構築

・ 通常業務内で依頼された集団および重症例の臨床検体(髄液、血清、咽頭拭い液、便、尿)を次世代シーケンサーにより網羅配列解読を行う(研究分担者:小澤・齋藤・調・佐多・館田)。感染研では、各地研からの要望に応じて不明・重症例について適宜、網羅配列解読(研究代表者:黒田)および病理検体から新規、既知病原体の検索を行う(研究分担者:片野)

・ 得られた配列をネットワーク経由で感染研(代表者:黒田)に転送し、担当者相互で病原体検索にあたる。従来の鑑別診断結果と網羅配列解読法の結果が符合するの照合し、一般検査法と網羅配列解読法の特異性・感度について検討する(研究代表者:黒田、研究分担者:小澤・齋藤・調・佐多・館田)

2. 不明感染症疑いの中でも厚労行政上で最重要項目である重症例を最優先し、想定以上の増悪に関わる混合感染など病原因子の特定も検討する。(研究代表者:黒田、研究分担者:小澤・齋藤・調・佐多・館田・片野)

(倫理面への配慮)

試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられる。本研究班で対象となる患者から検体を採取する場合は、各医療機関の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。緊急の対応が必要であったり、各医療機関の倫理委員会で検討できない場合は、感染研の倫理委員会で包括的に審査されるものとする。

連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々の ID とし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこの ID を運用して行う。申請者には ID が付けられた検体と添付の情報が送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する(連結可能匿名化)。したがって、申請者において個人を特定することはできないようにする。本計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認を受けた(H25/7/30 No.417, H26/2/18 No.495)。

C. 研究結果

1) ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速な病原体鑑別に資するものと考えている(図1)。

配列解読後の情報解析に必須である Web interface による情報解析パイプラインを複数用意

した(図1)。

各分担研究者による不明症例の NGS 検査成績について図2にまとめた(詳細は各分担研究者の報告書を参照)。

2) 各自治体検査機関の有機的な連携

本研究班の2年間を終え、各自治体主導で不明症例の NGS 検査成績が出るようになり、現場単独でも NGS 検査を有効に活用できることが実証された(図2)。本成績の中で特筆すべきことで、富山県衛生研究所の NGS 検査結果で、不明下痢症(2013年)から検出されたサポウイルスが2012年4月の名古屋市・仕出しや弁当による集団食中毒のサポウイルスと同一であることが塩基配列の遺伝型から判明した。名古屋市の集団食中毒は、感染研・ゲノムセンターが依頼検査を受け病原体(サポウイルス)特定した事例であったため、すぐさま富山県の事例と名古屋市の事例に強い関連性を見出すことができ、双方機関へ迅速に情報伝達をすることができた。

短期的に集団発生した感染症事例であれば隣県同士で情報共有は迅速に行われるだろうが、長期的かつ散発する事例では、同一の汚染源であっても関係性を特定するエビデンスが乏しく、実地疫学情報のみでは因果関係を明確に示すことが困難であると考えられる(図3)。病原体のゲノム・遺伝型情報を有効活用すれば、長期的に発生する散発事例においてバラバラに見えていた事例が共通の事象と関連が深い可能性を指摘できるだろう。分解能の高いゲノム・遺伝型情報を応用し、実地疫学だけでは見えない情報を提供できるものと考えている。

3) 研究計画3年目への課題

NGS 検査の感度・特異性・有効性については明らかにメリットがあるが、既存検査と比べて未だコスト高であることは間違いない(図4)。分子疫学として高分解能を有し労力も比較的少ないことから、今後の更なる技術革新(シリコン半導体による DNA シーケンサー)が病原体検査の根本を変革し、各種検査でも陰性になった不明症例のための NGS 検査ではなく、病原体検査の1次スクリーニングとしても機能する魅力を秘めている。

ただし、NGS の更なる技術革新においても現状のネットワーク転送速度では、地研からの大量データを感染研へ迅速に情報転送ができず支障が生じている。3年目の課題として、このボトルネックを解消すべく、転送方式を2種類用意して有効な手段を探る予定である(図5)。

NGS 検査による不明症例の解明において、未だ不明のまま処理される症例が後を絶たない。NGS 検査でも不明のまま放置される症例への対応として、急性期 IgM 陽転を測定する高感度 ELISA 系の開発準備を行っている。主要ウイルス 31 種(48 遺伝子)を対象に、小麦胚芽・無細胞系タンパク合成により抗原タンパク質を調整して ELISA 検査系を開発予定している(分担研究者: 梁明秀教授)。NGS 検査との並行検査により、より精度の高い不明症例への検査体制の構築を模索する。

4) 網羅的病原体検査法の技術研修

臨床検体の DNA/RNA 調整、ライブラリー作製、MiSeq 次世代シーケンサー解読、情報解析までの技術研修を執り行った(4日間)。

・技術研修を修了した拠点:

福岡県保健環境研究所
福井県衛生環境研究センター
東邦大学・医学部
岩手県環境保健研究センター
愛媛県立衛生環境研究所

得られた成果については各分担者の研究報告書を参照。

D/E. 考察・結論

現在、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターにて感染症疑いの不明症例に対して行政検査・依頼検査を遂行中である。ゲノム情報を有効に活用した病原体検査の今後として、ゲノム情報をどのように有効活用していくのか?という課題が残っている。感染研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サーバー MePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) の運用を開始し、分担研究者においては不明症例の解明に NGS を活用できている。一般的に、検査現場では “効率的かつ省力化された病原体検査” の要望が強く、NGS 技術はそれを可能にするひとつの手段だと考えている。この革新的な技術をさらに発展的に運用するためには、“技術指導、充実した検索データベース構築” の両方が不可欠であると考えられる。2年目の本年度は計5機関の検査担当者に技術研修を行い、各検査機関で懸案になっていた不明症例への解明を遂行した。

病原体ゲノム情報は将来的に “可用性・互換性・継続性” の高い情報源として運用が可能であり、主要各国(米国 CDC/FDA, 英国 PHE)と “ゲノム情報”

基盤とした病原体検索データベースの共同運用も可能になるであろう。

今後、不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。今後さらに重厚な感染研と連携ネットワークを構築し、迅速に病原体検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

F . 健康危険情報 とくになし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 5:8185
- 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.* 28:183-91, 2014.
- Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H*. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.
- Doi I, Nagata N, Tsukagoshi H, Komori H, Motoya T, Watanabe M, Keta T, Kawakami M, Tsukano T, Honda M, Ishioka T, Takeda M, Ryo A, Kuroda M, Oishi K, Kimura H. An outbreak of acute respiratory infections due to human respiratory syncytial virus (HRSV) in a nursing home for the elderly in Ibaraki, Japan, 2014. *Jpn J Infect Dis.* 67(4): 326-327, 2014.

2. 学会発表

- NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22nd - 23rd January, 2015. Venue; Sunshine City Conference Room No.14. The

fifth floor, World Import Mart Building, 3-1-1 Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo, JAPAN. "Pathogen Genomics for Public Health" Makoto KURODA.

- 黒田誠 次世代シーケンス技術の臨床検査応用 第26回日本臨床微生物学会総会・学術集会 東京新宿 2015.2.1
- 2014 International Hua-Xia Medicine Summit Forum on Human Genes. China. H26.4.17 -20.

H . 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

感染症対策・検査体制に係る次世代型病原体検索システム



図1 ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム。地方衛生研究所等に整備された次世代シーケンサー MiSeq の迅速・効率的な運用のため、各種微生物検査の用途に合わせた Web interface による情報解析プログラムを提供中（共同研究）である。

分担研究者における NGS検査の成果・活動状況

- ❖ **群馬県衛生環境研究所**
 - 急性膵炎 ➡ HHV-6
 - 脳症 ➡ HPIV-2
 - エンテロウイルス流行期 ➡ HPIV1, CoxA6
- ❖ **山口環境保健センター**
 - 呼吸器感染症で頻出する HPIV4 の全ゲノム解読
- ❖ **富山県衛生研究所**
 - 集団食中毒下痢症 ➡ サボウイルス(2012年名古屋・集団食中毒と同等の塩基配列)
- ❖ **東邦大学・医学部**
 - 感染性心内膜炎
 - 脳膿瘍 ➡ *Aggregatibacter*, *Fusobacterium* の混合感染
 - 脳炎疑い ➡ Human parechovirus 3
- ❖ **感染研・感染病理部**
 - 不明心筋炎 ➡ trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)
Int J Clin Exp Pathol 2014. 7:5308-5312.
- ❖ **研究協力者:**
 - 迅速検査キットでは陰性であった成人のロタウイルス下痢症(栃木衛研)

図2 分担研究者・研究協力者にて得られた不明症例の NGS 検査結果の概要。

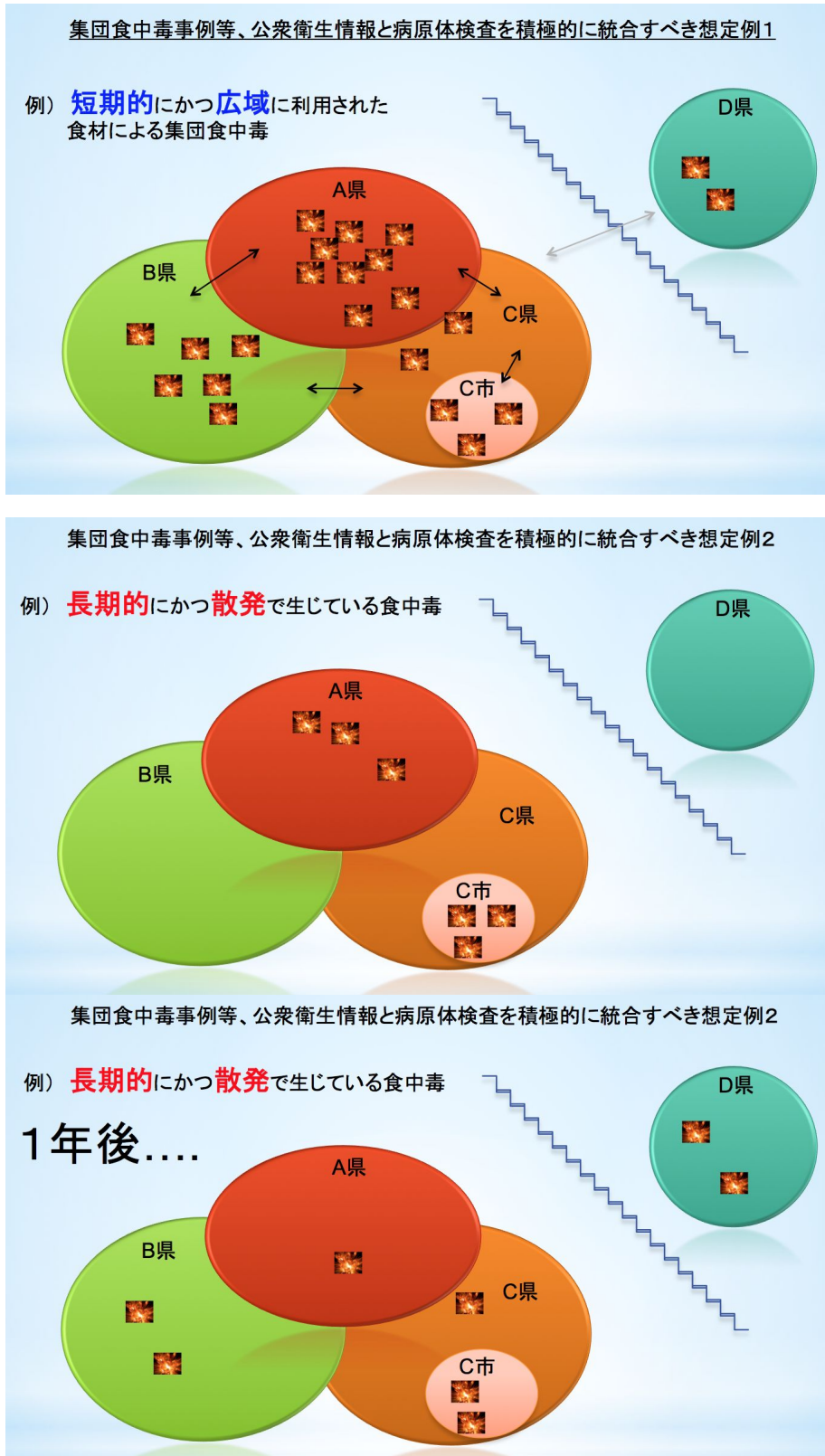


図3 病原体検査・病原体遺伝型情報の効率的な公衆衛生への還元。短期的かつ広域に発生した集団食中毒事例においては各自治体の連携は速やかに整うだろう。しかしながら、長期的に発生する散発事例においてバラバラに見えていた事例が、病原体の遺伝型情報を活用すれば共通の事象と関連が深い可能性を指摘できる。分解能の高いゲノム・遺伝型情報を適用し、実地疫学だけでは見えない共通事項を探る。

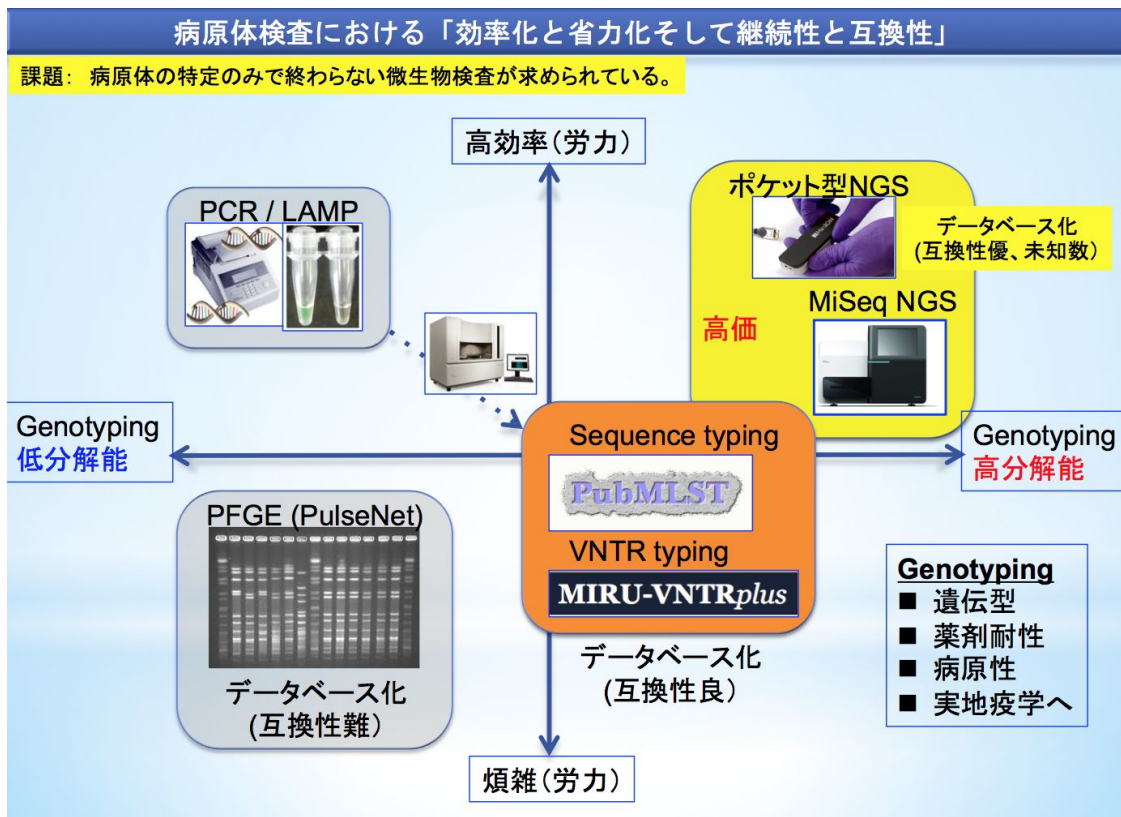
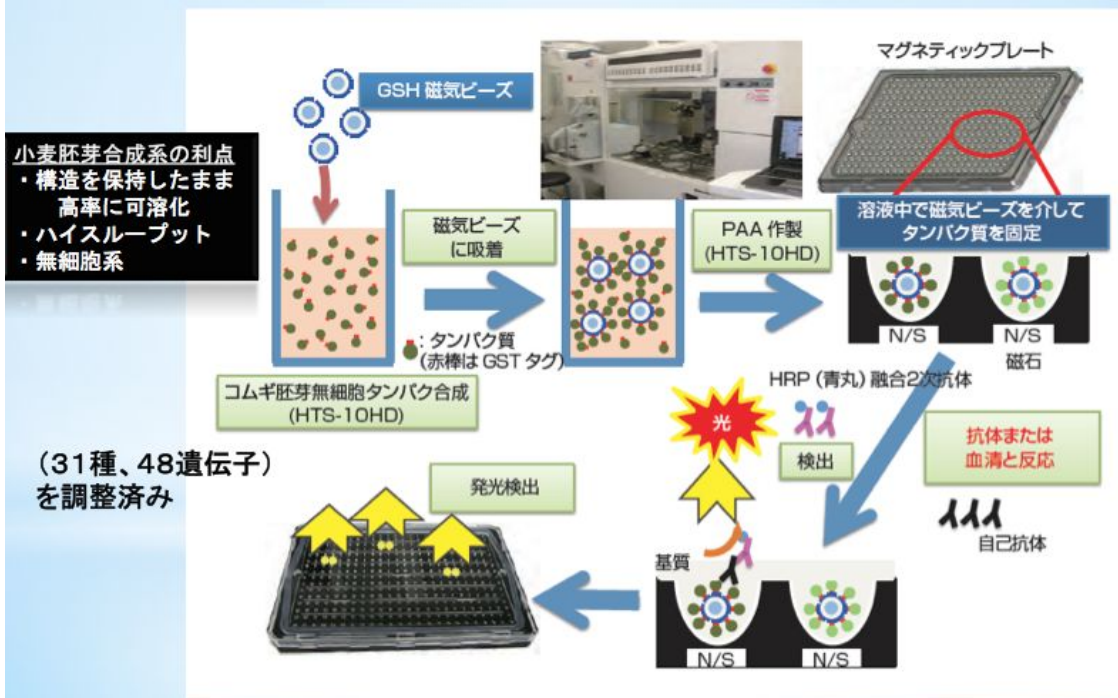


図4 病原体検査・遺伝子型別の手法ごとに分解能と労力を分布図としてプロットした。



図5 本研究課題の3年目の課題。各分担研究所において NGS 検査が稼働し、感染研・ゲノムセンターでも web 解析ツールを用意出来た。しかしながら、NGS が排出する大量データのネットワーク転送に時間を要し、迅速性を活かしてきていない。そこで、2種類の転送形式を検討し解決を図る。

* プロテインアレイの作製と抗体測定の流れ



川上、五島、Synthesiology, 2014, 改変

図6 NGS 検査でも不明のままになる症例にたいし、急性期 IgM 陽転を測定する高感度 ELISA 系の開発準備を行っている。主要ウイルス 31 種(48 遺伝子)を抗原候補にして、小麦胚芽・無細胞系タンパク合成により抗原タンパク質を調整して ELISA 検査系を開発予定(分担研究者: 梁明秀教授)

ゲノム情報を有効活用した病原体検査の今後

課題: ゲノム情報をどのように有効活用していくのか?

- ◇ 検査現場で “効率的でかつ省力化された病原体検査” の要望が強い。
- ◇ 次世代シーケンサー (NGS) はそれを可能にするひとつの技術だと考えられ、NGS検査を効率的に運用するための “技術指導”・ “充実した検索データベース構築” の両方を担当する。
- ◇ 感染症法に規定される各種病原体のゲノムデータベースを構築
 (別枠の研究班で)
- ◇ 将来発生しうる感染症に有効な検査システムを整備する。
- ◇ 米国CDC/FDA, 英国PHE においては病原体ゲノムデータベースの構築を既に遂行しており、将来的に可用性・互換性・継続性の高い情報源として主要各国と “ゲノム情報” を共同運用することが可能。
- ◇ ゲノム情報を活用したリスク因子の予測は、将来発生しうるヒト適応型病原株の迅速な監視に貢献できる。