

地方衛生研究所における次世代シーケンサーを活用した感染症検査

研究代表者

黒田誠 国立感染症研究所

分担研究者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

研究協力者

丹羽祥一 佐々木佳子 塚越博之 吉住正和 群馬県衛生環境研究所

菅井和子 独立行政法人国立病院機構福山医療センター

研究要旨

次世代シーケンサー (NGS)は大量の核酸配列を網羅的に解読することができるため、従来法では特定が困難なウイルスも塩基配列から検出する事ができる有力なツールである。本研究では、感染症発生動向調査などへの応用を視野に入れて流行期におけるウイルス検査および重症例など臨床の現場で原因の特定が期待される感染症の検査においてNGSを活用し、その有用性に関する検討を行った。NGSにより検出されたウイルスの遺伝子はRT-PCR法により確認を行い、さらに得られた遺伝子から分子系統樹解析を行った。その結果、エンテロウイルス流行期においてエンテロウイルスが検出されなかった咽頭ぬぐい液からヒトパラインフルエンザウイルス1型が、不明症例（脳症）として検査を行った咽頭ぬぐい液からヒトパラインフルエンザウイルス2型が検出された。これらのことから、NGSは高感度に幅広くウイルスを検出することができるため、原因の特定が困難なケースにおいて有力な検査法であることが示された。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）では、感染症発生動向調査事業をはじめとして多くの感染症における病原体の検査を行っている。特に、集団発生などにおいて早期に病原体を特定することは公衆衛生上とても有意義である。

近年、遺伝子検査により病原体を特定する技術は急速に発展している。中でも次世代シーケンサー (NGS)は、核酸塩基配列を偏見無く網羅的に解読することができる。NGSは、従来から行われてきた(RT-)PCRなどで同定が困難であった易変異性RNAウイルスや未知の病原体の検査においても有用である。そこで、本研究ではNGSを活用して、エンテロウイルス感染

症の流行期におけるNGSの活用法について検討を行うとともに、医療現場において原因となる病原体の推定が困難である症例（不明症例）におけるNGSの有用性について検討を行った。

B. 研究方法

感染症発生動向調査事業により採取された咽頭拭い液8検体を材料とした。不明症例では急性腭炎（好酸球性増多あり）から採取された咽頭ぬぐい液、鼻汁、便、血清および脳症の患者より採取された咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液、血清の合計8検体を使用した。ウイルスRNAは、QIAamp Viral RNA Mini kit[®] (QIAGEN)を

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[®] (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[®] (Illumina) を用いて Miseq[®] (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¹。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。急性膀胱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²。

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。

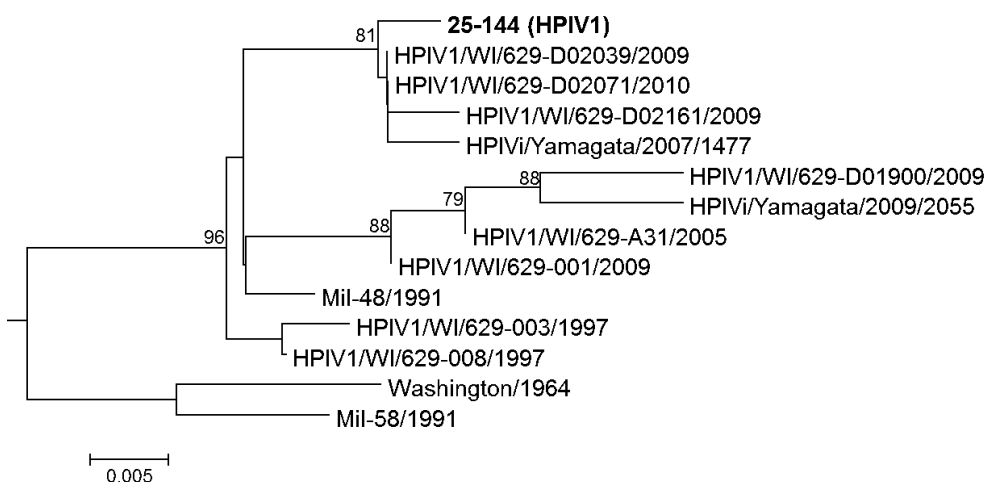


図1 エンテロウイルス疑い症例から検出されたパラインフルエンザウイルス1型

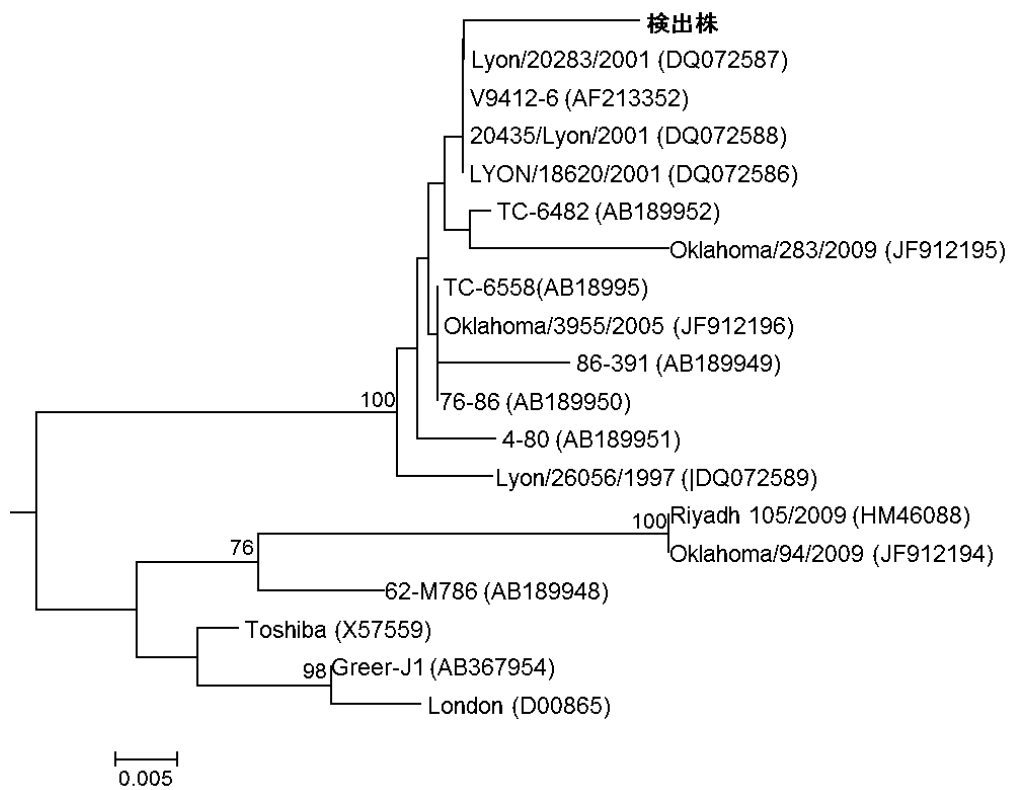


図2 脳症患者から検出されたパラインフルエンザウイルス2型