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：小渕正次、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）<u>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</u>：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）<u>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</u>：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、散発例 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）次世代シークエンサー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十万リードを越えた。

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)。ダイレクトシークエ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 ライブラリー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、Cay-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が期待される。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．次世代シークエ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.

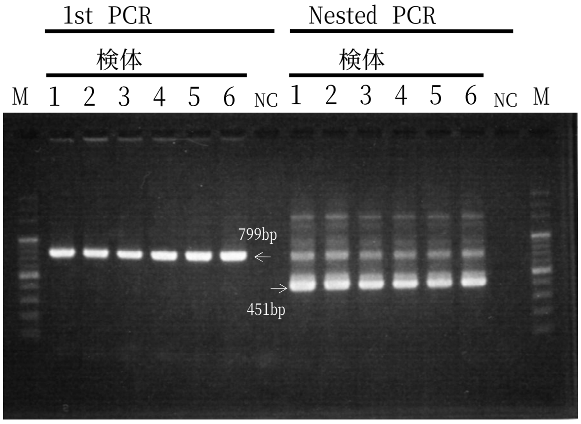
H. 知的財産権の出願・登録状況
　なし

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	GTGGGATTAACTCCAGGAGG	−	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

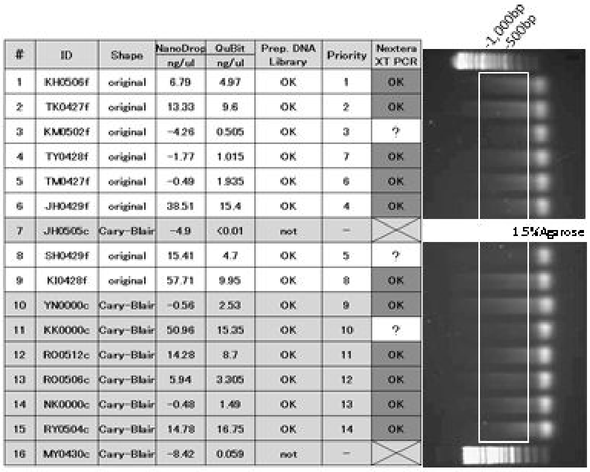
検体	総リード数	MePIC リード数	細菌 リード数	細菌 リード数 の割合	ウイルス リード数	ウイルス リード数 の割合
脳炎・脳症(血清)	48988	4239	707	16.7	22	0.5
脳炎・脳症(血清)	212092	14305	1091	7.6	24	0.2
脳炎・脳症(咽頭拭い液)	140338	46064	19695	42.8	118	0.3
脳炎・脳症 (便)	286498	38260	14513	37.9	25	0.1
脳炎・脳症(血清)	149138	11022	549	5.0	30	0.3
平均	167411	22778	7311	32.1	44	0.2
無菌性髄膜炎 (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



#	ID	Shape	NanoDrop ng/ul	QuBit ng/ul	Prep. DNA Library	Priority	Nextera XT PCR
1	KH0506f	original	6.79	4.97	OK	1	OK
2	TK0427f	original	13.33	9.6	OK	2	OK
3	KM0502f	original	-4.26	0.505	OK	3	?
4	TY0428f	original	-1.77	1.015	OK	7	OK
5	TM0427f	original	-0.49	1.935	OK	6	OK
6	JH0429f	original	38.51	15.4	OK	4	OK
7	JH0505c	Cary-Blair	-4.9	<0.01	not	-	
8	SH0429f	original	15.41	4.7	OK	5	?
9	KI0428f	original	57.71	9.95	OK	8	OK
10	YN0000c	Cary-Blair	-0.56	2.53	OK	9	OK
11	KK0000c	Cary-Blair	50.96	15.35	OK	10	?
12	RO0512c	Cary-Blair	14.28	8.7	OK	11	OK
13	RO0506c	Cary-Blair	5.94	3.305	OK	12	OK
14	NK0000c	Cary-Blair	-0.48	1.49	OK	13	OK
15	RY0504c	Cary-Blair	14.78	16.75	OK	14	OK
16	MY0430c	Cary-Blair	-8.42	0.059	not	-	

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

	Spcimen shape	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	