

「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。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。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。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、 1.4×10^5 ~ 9.7×10^5 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

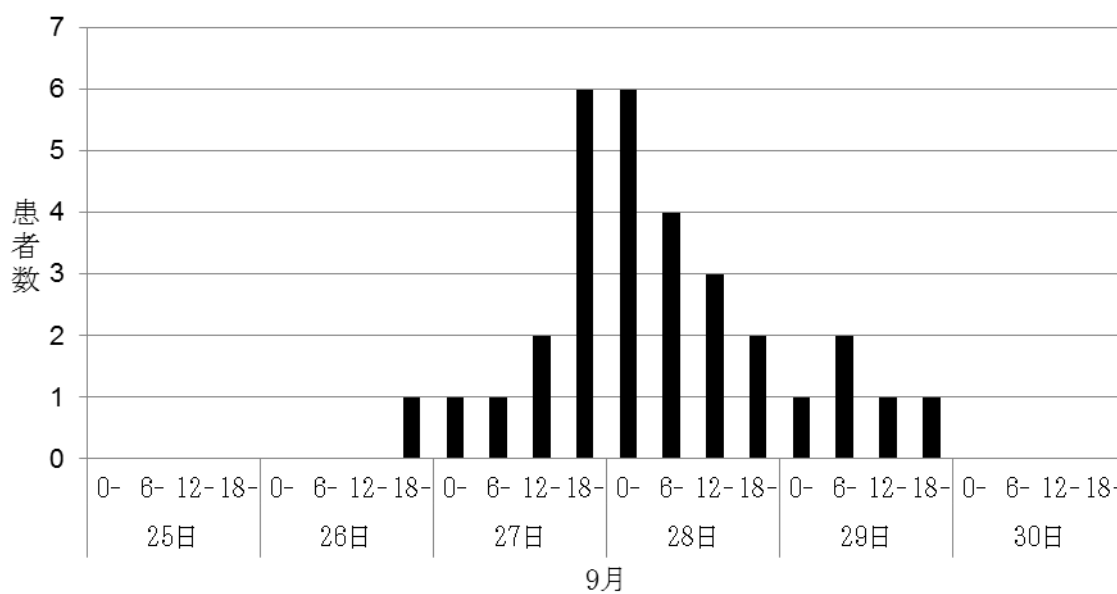


表 解析結果

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 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