

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)

**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**

(H25-新興-一般-015)

平成26年度  
総括・分担研究報告書

平成27年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

# 目次

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)

1. 平成26年度総括研究報告書  
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・・・・・・・・・・ 1  
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
  
2. 平成26年度分担研究報告書
  - I. 病原体網羅遺伝子配列を基盤とした分子疫学解析法の開発・・・・・・・・・・ 9  
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第6室長  
研究協力者  
丹羽祥一 塚越博之 吉住正和 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)  
筒井理華(青森県環境保健センター)  
高橋雅輝(岩手県環境保健研究センター)  
水越文徳(栃木県保健環境センター)  
安達啓一(愛知県衛生研究所)  
平野映子(福井県衛生環境研究センター)  
吉富秀亮 芦塚由紀(福岡県保健環境研究所)  
松島勇紀(川崎市健康安全研究所)  
柴田伸一郎(名古屋市衛生研究所)  
石井晴之 倉井大輔 皿谷健 滝澤始(杏林大学医学部第1内科学)  
長澤耕男 下条直樹(千葉大学医学部小児科)  
石和田稔彦(千葉大学真菌医学研究センター)  
宮地裕美子(国立病院機構横浜医療センター)  
菅井和子(国立病院機構福山医療センター)  
松田俊二(国立病院機構愛媛医療センター)  
岡崎薫(国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター)  
清水博之(横浜市立大学附属市民総合医療センター)  
小張真吾(藤沢市民病院小児科)  
森田幸雄(東京家政大学)  
楠英樹 石岡大成 佐藤弘 加納和彦 関塚剛史 竹内史比古 野田  
雅博(国立感染症研究所)
  
  - II. 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・・・・ 17  
研究分担者 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)
  
  - III. 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・・・・・・・・・・ 21  
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、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)

IV. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 6

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)

V. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 4

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)、高橋雅輝、佐藤直人(岩手県環境保健研究センター)

VI. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 8

研究分担者 舘田一博 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

研究協力者 青木弘太郎、嵯峨 知生、石井 良和(東邦大学医学部微生物・感染症学講座)

VII. 不明症例の病理検体からの新規病原体検索・・・・・・・・・・ 4 2

研究分担者 片野晴隆 国立感染症研究所・感染病理部

研究協力者 福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、長谷川秀樹(国立感染症研究所・感染病理部)、黒田 誠、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)、李 天成、脇田隆字(国立感染症研究所・ウイルス第2部)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、梁 明秀(横浜市大医学部)

VIII. 病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による

抗原解析と新規病原体検査法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 7

研究分担者 梁明秀 横浜市立大学医学部微生物学

研究協力者 松永智子(横浜市立大学医学部微生物学)

3. 研究発表一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 1

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腭（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。



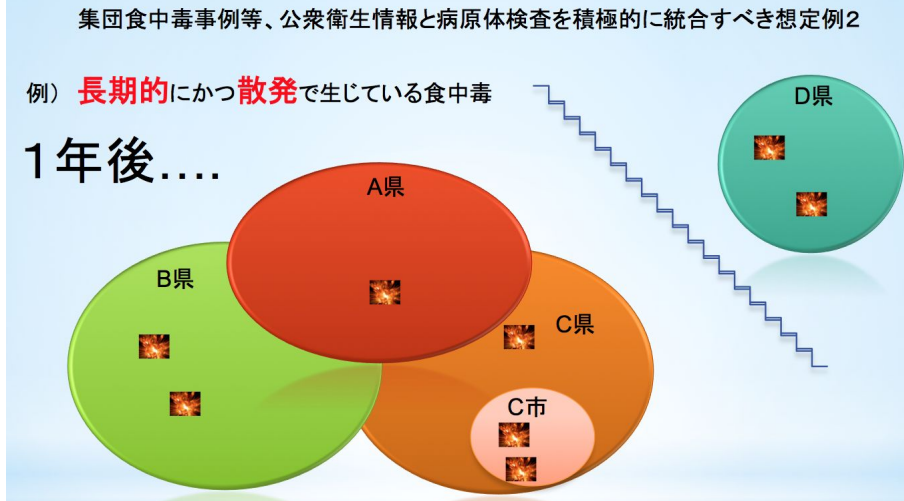
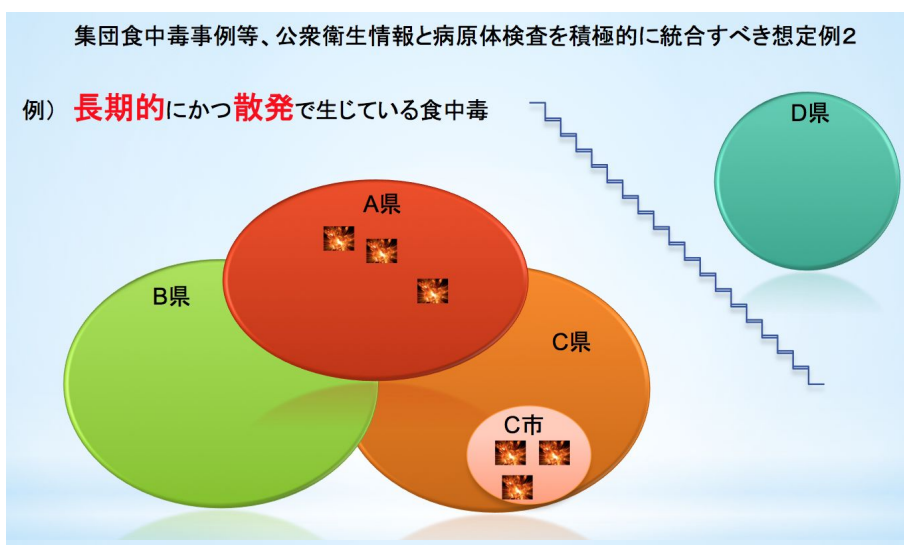
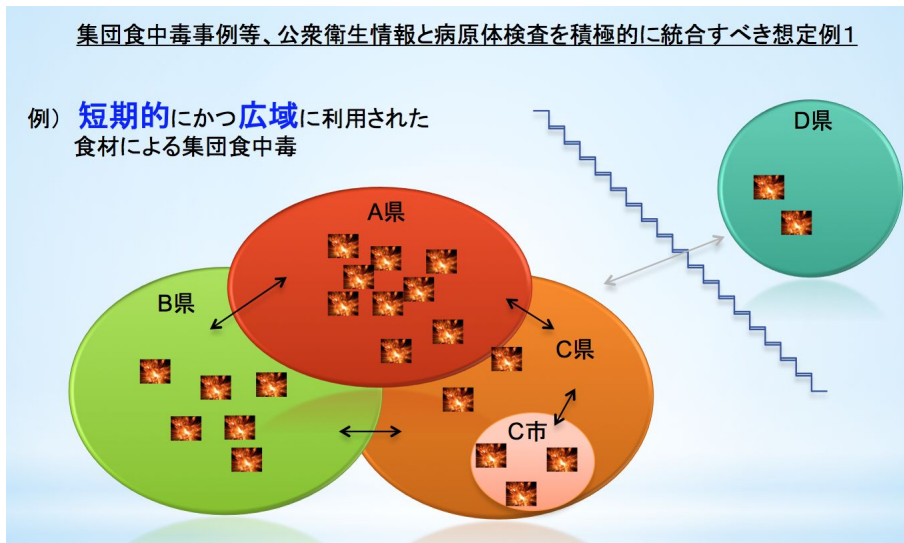


図3 病原体検査・病原体遺伝型情報の効率的な公衆衛生への還元。短期的かつ広域に発生した集団食中毒事例においては各自治体の連携は速やかに整うだろう。しかしながら、長期的に発生する散発事例においてバラバラに見えていた事例が、病原体の遺伝型情報を活用すれば共通の事象と関連が深い可能性を指摘できる。分解能の高いゲノム・遺伝型情報を適用し、実地疫学だけでは見えない共通事項を探る。

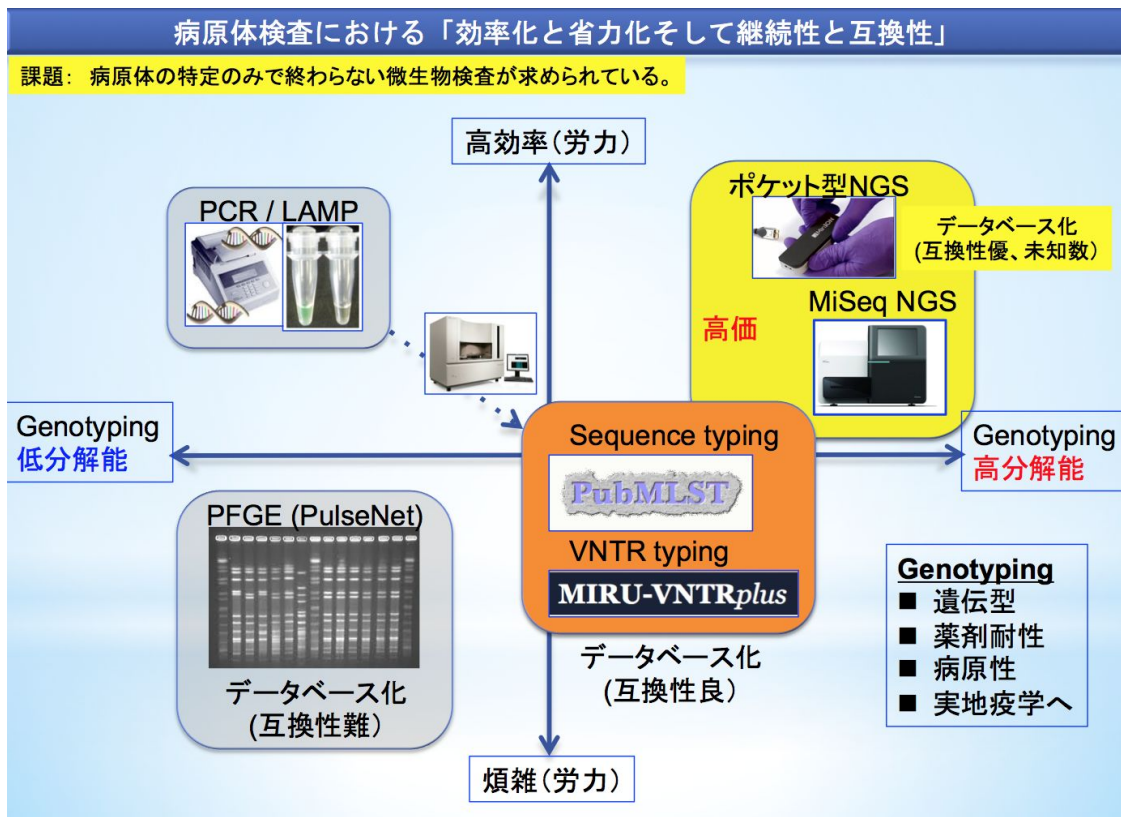
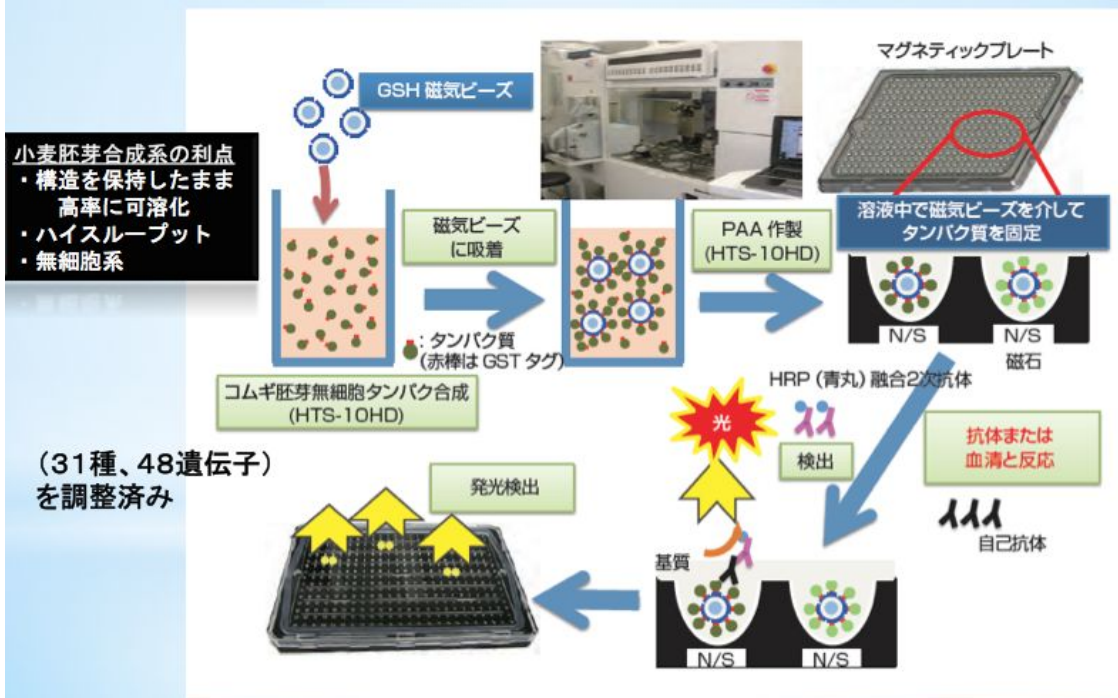


図4 病原体検査・遺伝子型別の手法ごとに分解能と労力を分布図としてプロットした。



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れていない。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。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
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長

**病原体網羅遺伝子配列を基盤とした分子疫学解析および解析法の開発**

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第6室長

研究協力者

丹羽祥一 塚越博之 吉住正和 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）

筒井理華（青森県環境保健センター）

高橋雅輝（岩手県環境保健研究センター）

水越文徳（栃木県保健環境センター）

安達啓一（愛知県衛生研究所）

平野映子（福井県衛生環境研究センター）

吉富秀亮 芦塚由紀（福岡県保健環境研究所）

松島勇紀（川崎市健康安全研究所）

柴田伸一郎（名古屋市衛生研究所）

石井晴之 倉井大輔 皿谷健 滝澤始（杏林大学医学部第1内科学）

長澤耕男 下条直樹（千葉大学医学部小児科）

石和田稔彦（千葉大学真菌医学研究センター）

宮地裕美子（国立病院機構横浜医療センター）

菅井和子（国立病院機構福山医療センター）

松田俊二（国立病院機構愛媛医療センター）

岡崎薫（国立病院機構四国こどもととなの医療センター）

清水博之（横浜市立大学附属市民総合医療センター）

小張真吾（藤沢市民病院小児科）

森田幸雄（東京家政大学）

楠英樹 石岡大成 佐藤弘 加納和彦 関塚剛史 竹内史比古 野田雅博  
（国立感染症研究所）

研究要旨

次世代シーケンサーを応用し、本邦において検出されたヒトライノウイルスC（HRV-C）VP1～3全長遺伝子の分子進化に関する研究を行った。時系列系統解析には Bayesian MCMC 法を用いた。株間の遺伝学的距離（*p*-distance）解析、SimPlot 解析および Positive/negative selection 解析も行った。さらに、VP1～3蛋白の構造解析シミュレーションも行った。その結果、各々の遺伝子は独立かつ速い速度（ $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year）で進化し、検出株は40以上の遺伝子に分類されるとともに起源は400～900年前に遡ることが推定された。また、検出株はきわめて遺伝学的に多様であるだけでなく、positive selection siteは検出されなかった。さらに、抗原蛋白外側に、アミノ酸置換部位がきわめて多いことも推定された。以上のことから、HRV-Cの主要抗原遺伝子（VP gene）は数百年にわたり速い速度で進化しながら遺伝学的に多様化したことが示唆され

た。また、抗原蛋白は生体防御の圧力を受けにくい性質を有することも推定された。

## A. 研究目的

ヒトライノウイルス (human rhinovirus, HRV) は、種々の呼吸器感染症 (通常感冒、気管支炎および肺炎) の起因となるだけでなく、気管支喘息の発症増悪に関与することが示唆されている。実際、Johnston らの報告によれば、喘息増悪時の 80% にライノウイルスが検出されている<sup>1</sup>。

HRV は、3 つの種 (HRV-A, -B および C) に分類されている。HRV-A と B は多数の血清型に分類されており、両者を合わせて、現在 100 種類以上の血清型の HRV が同定されている。一方、HRV-C は、近年、新たに発見されたウイルスで、細胞培養が困難であるため、このウイルスの検出には、HRV-A と B と同様に遺伝子配列が比較的保存的な VP4/VP2 領域を標的とした RT-PCR を主体とした検出・解析法が用いられている。HRV-C は HRV-A と同様に遺伝学的にきわめて多様であることが示唆されているが不明な点が多い。くわえて、ウイルス抗原 (VP 蛋白) をコードしている VP1-4 遺伝子 (viral protein gene) の進化に関する不明な点が多い。しかし、株間の遺伝学的多様性のため、通常の primer walking 法での主要抗原の遺伝学的解析は極めて困難であることが予想される。そこで、我々は、既報の HRV-C 塩基配列を網羅的に解析し、新たなプライマーセットを設計するとともに、VP1-3 遺伝子全長を含む約 5.8kb の HRV-C の PCR 産物を次世代シーケンサーにより網羅解析を行い、HRV-C 臨床株 139 株の VP1-3 遺伝子の詳細な分子進化に関する解析を行ったので以下に報告する。

## B. 研究方法

検体は、2007 年 11 月から 2013 年 3 月の間に、栃木県、福井県、熊本県における感染症発生動向調査および横浜医療センターにおいて採取した急性呼吸器感染症 (ARI) 患者 2922 名の鼻咽頭ぬぐい液を使用した。

RNA は、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて抽出し、プライマーを HRV-C\_546F: 5'-

CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3' と HRV-C\_6410R: 5'-CCRTCATARTTDGTRTARTCAAA-3' 使用して PrimeScript<sup>®</sup> II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (TaKaRa Bio) にて遺伝子増幅を行った。得られた DNA を Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina) でライブラリーを作成し MiSeq (Illumina) により解読を行った。得られた塩基配列は、CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) によりアライメントし、Kakusan 4 program version 4.0 (<http://www.fif-thdimension.jp/products/kakusan/>) により塩基置換モデルを選択し Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 法による解析を BEAST package version 1.8.0 を使用して行った<sup>2</sup>。さらに、Datamonkey [<http://www.datamonkey.org/>]において、positively/negatively selected sites の解析を single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL), および internal fixed effects likelihood (IFEL) の 3 つの方法で行い、MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) を使用して pairwise-distance ( $p$ -distance) を計算した<sup>3</sup>。

HRV-C の VP1, VP2, VP3 タンパク質の 3 次元構造モデルは、Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group Inc.) の 'MOE-Align' と 'MOE-Homology' を使用してホモロジーモデリングにより作成し、アミノ酸の多様性は shannon entropy scores を使用して解析した<sup>4,5</sup>。

## C. 結果

RT-PCR 法により 187 の増幅産物が得られ、NGS による解析を行ったところ、139 産物で完全長の VP1, VP2 および VP3 遺伝子完全長領域を含む解析可能な塩基配列が得られた。

まず、MCMC 法により VP1 遺伝子 (804-846nt) を解析したところ、解析株は 3 系統に分類された (図 1)。さらに 13% の divergence を基準として genotyping したところ 44 種類の遺伝子型に分類できた (図 1)。各系統の共通の祖先は、1652 年

(95% highest posterior density (HPD); 1522 年から 1769 年)に分岐した(図 1)。VP1 の進化速度は、 $3.48 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.36 \times 10^{-3}$  から  $4.60 \times 10^{-3}$ )であった。

次に、VP2 遺伝子(783–816nt)は、MCMC 法により作成した系統樹で 4 系統に分類された(図 2)。さらに VP1 遺伝子と同様に 13% の divergence を基準として genotyping したところ 43 種類の遺伝子型に分類できた。各系統の共通の祖先は、1294 年 (95% highest posterior density (HPD); 853 年から 1643 年)に分岐した(図 2)。VP2 遺伝子の進化速度は、 $1.35 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.12 \times 10^{-3}$  から  $6.46 \times 10^{-4}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子と同様に VP2 遺伝子にも幅広い多様性があることが分かった。

VP3 遺伝子(699–717nt)も同様に MCMC 法による時系列系統解析を行ったところ、3 系統に分類された(図 3)。さらに、13% の divergence を基準として genotyping したところ 42 種類の遺伝子型に分類できた(図 3)。各系統の共通の祖先は、1628 年 (95% highest posterior density (HPD); 1494 年から 1746 年)に分岐したことが推定された(図 3)。VP3 遺伝子の進化速度は、 $3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year (95% HPD  $2.63 \times 10^{-3}$  から  $4.91 \times 10^{-3}$ )であり、これらの結果から VP1 遺伝子や VP2 遺伝子と同様に VP3 遺伝子も幅広い遺伝学的多様性を有することが分かった。

VP1 遺伝子の株間での塩基配列同一性(identity)は 60.2 ~ 100% であり、塩基同一性は 58.5 ~ 100% であった。さらに VP1 遺伝子における株間の塩基配列を基盤とした  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 4)。

VP2 遺伝子では株間の塩基の同一性は 60.2 から 100% であり、塩基の同一性は 58.5 から 100% であった。さらに VP1 遺伝子同様に VP2 遺伝子における株間の  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、

$0.29 \pm 0.11$  であった(図 5)。

VP3 遺伝子の株間の塩基の同一性は 60.2 から 100% であり、塩基の同一性は 58.5 から 100% であった。さらに VP3 遺伝子においても株間の  $p$ -distance を計算したところ、全体の  $p$ -distance は  $0.34 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  standard deviation, SD) であり、系統 1、2 および 3 の  $p$ -distance は、それぞれ  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.28 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.11$  であった(図 6)。

また、解析遺伝子の positively/negatively selected sites の解析を行ったところ、positive selection site は見られず、100 以上の negative selection site が検出された。加えて、HRV-C の VP1、VP および VP3 蛋白の 3 次元構造モデルからキャプシド内側に比べて、外側に高頻度のアミノ酸置換が生じていることが推定された(図 7)。

#### D. 考察

今回我々は、次世代シーケンス(NGS)を応用した HRV-C 臨床株 139 株の完全長 VP1-3 遺伝子の分子進化に関する研究を行った。ベイジアン MCMC 法による時系列系統解析の結果、解析株は 3 あるいは 4 系統に分類された。これらの株はさらに 40 以上の遺伝子型に細分類されることがわかった。解析株の VP1-3 遺伝子の起源は、1625、1125 および 1628 年に遡れることが示唆された。また、各々の遺伝子は、 $1.35 \sim 3.74 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year と非常に速い速度で進化していることが示唆された。株間の遺伝学的距離は平均 0.3 を超えていた。また、いずれの遺伝子にも positive selection site は検出されなかった。さらに、構造解析により、キャプシド外側にアミノ酸の置換が非常に多いことも明らかになった。

今まで、HRV は、VP4/VP2 領域解析が主体に行われていた。しかし、この領域は、解析領域が短いだけでなく、主要なウイルス抗原部分ではないため、HRV-C の抗原遺伝子の全長配列を用いた総合的な進化解析を行うことが困難であった。また、HRV の VP 遺伝子は遺伝学的にきわめて多様であるため、従来法、例えば primer walking 法による全長解析は困難であることが推定される。そこで、我々は本研究において、HRV のゲノムの 5'末端に

近いVP4遺伝子領域および3'末端に近い3D遺伝子領域の保存的な部位に着目し、独自のプライマーを設計し、RT-PCR法により、VP1-3遺伝子全長を含む5.8kbのPCR産物をNGSにより解析を行う方法を考案した。その結果、この方法により大半(70%)のHRV-CのVP1-3遺伝子の全長塩基配列解析に成功した。また、先端の遺伝子解析方法により、これらの主要抗原の進化解析に成功した。

今回の時系列系統解析により、各遺伝子は、400~900年前にその起源を遡ることが示唆された。また、各遺伝子は独立かつ独自に進化していることも推定された。さらに、その遺伝学的多様性も各遺伝子により異なることも推定された。

一般に、ウイルスの主要抗原は、宿主側の生体防御の圧力などにより、positive selectionが生じ、生存に有利な子孫が宿主集団に順化・適応していくことが示唆されている。しかし、今回の結果では、解析部位に、positive selection siteが検出されなかった。このことは、HRVのVP蛋白は宿主の生体防御の圧力を受けにくい性質を有することを示す。しかし、今後詳細なエピトープ解析も含め、さらなる解析が必要であると思われる。

次に、VP1-3の構造シミュレーションにより、キャプシド内側に比し、外側に高頻度にアミノ酸置換が生じていることが明らかになった。このことは、主要抗原遺伝子の多様性が、抗原性の多様性に密接に関連していることが構造上も示している。今後、他の種、HRV-Aと比較も含めた主要抗原構造に関する研究が必要であろう。

## E. 結論

NGSを応用した本邦の呼吸器感染症から検出された139株のHRV-Cの主要抗原全長遺伝子(VP1-3遺伝子)の分子進化に関する研究を行った。その結果、HRV-Cの主要抗原遺伝子は独自かつ非常に速い速度で進化していることが明らかになった。また、多種類(40種類以上)の遺伝子型のHRV-Cが本邦の呼吸器感染症に関与していることも推定された。

## F. 参考文献

1. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 310, 1225-9, 1995.
2. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214, 2007.
3. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*. 21;2531-2533, 2005.
4. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 82;11247-62, 2008.
5. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* 84, 8085-97, 2010.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 論文発表

1. 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.* in press.
2. 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.
3. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget.* 5(18):8665-80, 2014.
  4. Tsujimoto S, Tsukagoshi H, Inai I, Yoshimoto Y, Daida A, Kusakawa I, Tanaka-Taya K, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Oishi K, Ryo A, Kimura H\*. Apnea, dyspnea, and wheezing in primary lower respiratory infections due to human rhinovirus in Japanese infants. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(3):1, 2014.
  5. 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.
  6. Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M, Kimura H, Sakai K, Kato H, Takeda M, Kubota T. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKK $\epsilon$  and TBK1 on type I IFN production. *PLoS One.* 10;9(4):e94999. 2014.
  7. 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.
  8. Matsunaga S, Kawakami S, Okayama A, Tsukagoshi H, Kudoh A, Matsuo I, Matsushima Y, Shimizu H, Okabe N, Hirano H, Yamamoto N, Kimura H, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 5:208, 2014.
  9. Nidaira M, Kuba Y, Saitoh M, Taira K, Maeshiro N, Mahoe Y, Kyan H, Takara T, Okano S, Kudaka J, Yoshida H, Oishi K, Kimura H. Genetic analyses of VP3, VP1, 3Cpro, and 3Dpol coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 58(4): 227-38, 2014.
  10. Mizuta K, Tsukagoshi H, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Itagaki T, Nagano M, Noda M, Kimura H\*. Molecular evolution of hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene in human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture, Japan. *J Med Microbiol.* 63(4): 570-577, 2014.
  11. Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno H, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 11(1):9, 2014.
  12. Yamazaki M, Sugai K, Kobayashi Y, Kaburagi Y, Murashita K, Saito N, Niino H, Imagawa T, Tsukagoshi H, Kimura H. A child case of hypocomplementemic urticarial vasculitis due to Coxsackievirus type A9. *J Med Microbiol Case Rep.* 1(1):1-5, 2014.
  13. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A.



Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 33(5):643-52, 2014.

14. Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36(1):e65-8, 2014.

## 2. 学会発表

1. 小林美保他 第62回日本ウイルス学会学術集会(H26年11月10-12日)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

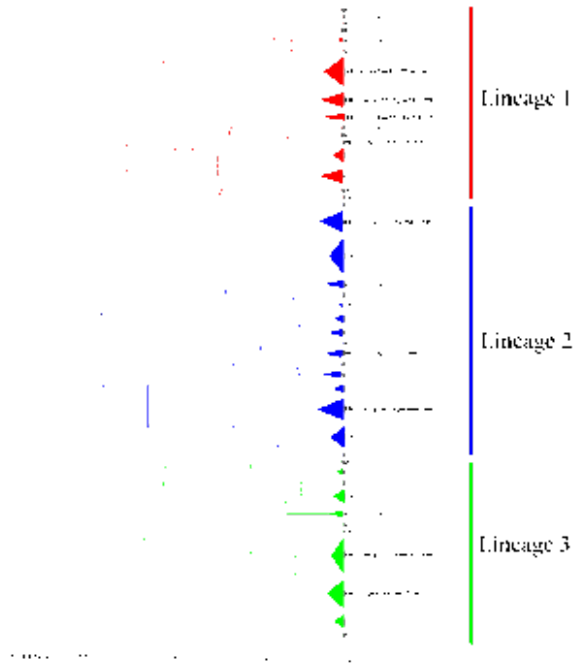


図1 VP1 遺伝子分子系統樹(MCMC法)

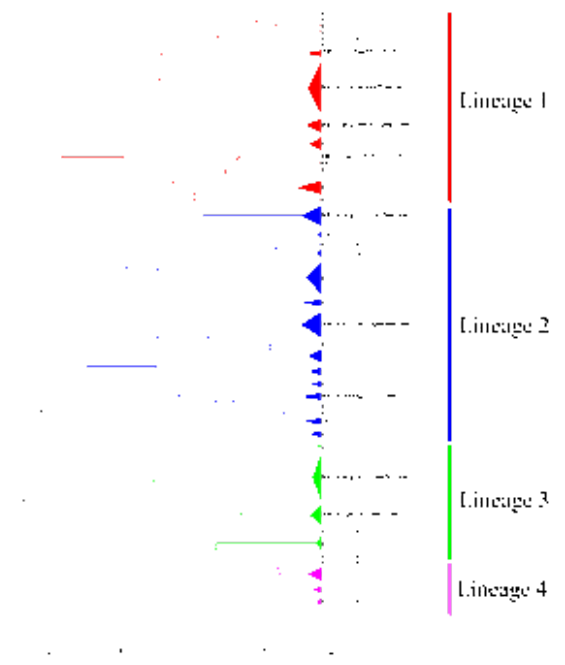


図2 VP2 遺伝子分子系統樹 (MCMC法)

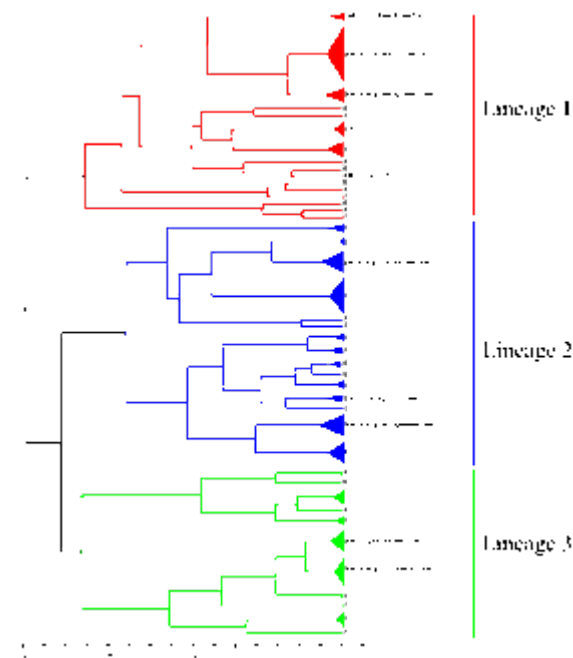


図3 VP3 遺伝子分子系統樹(MCMC法)

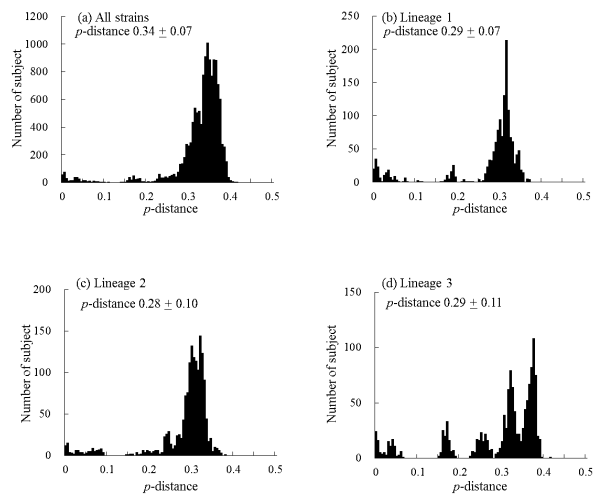


図4 VP1 遺伝子の  $p$ -distance

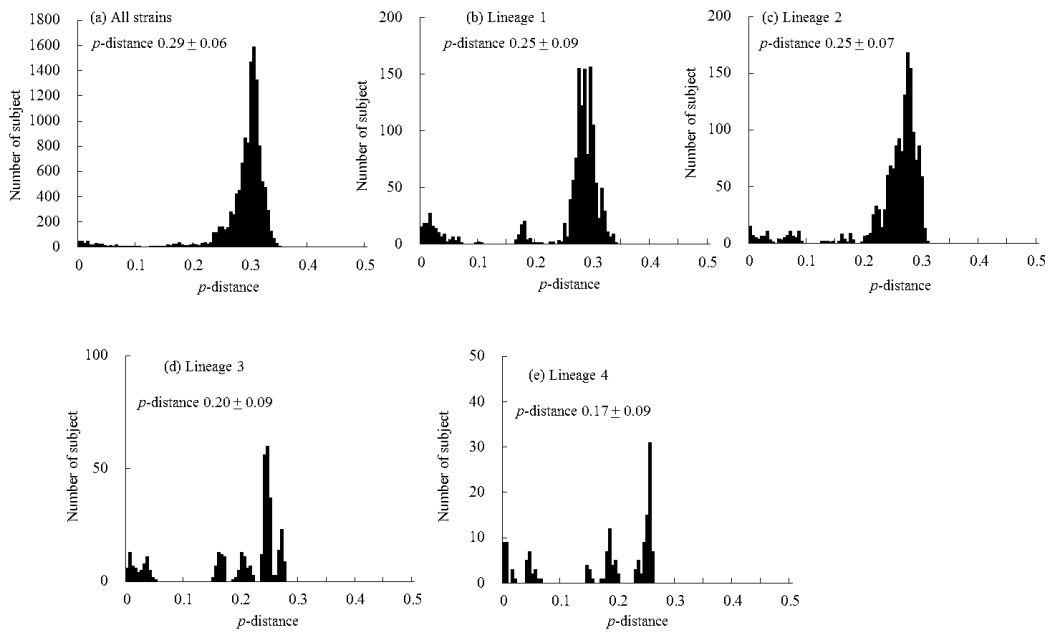


図5 VP2 遺伝子の  $p$ -distance

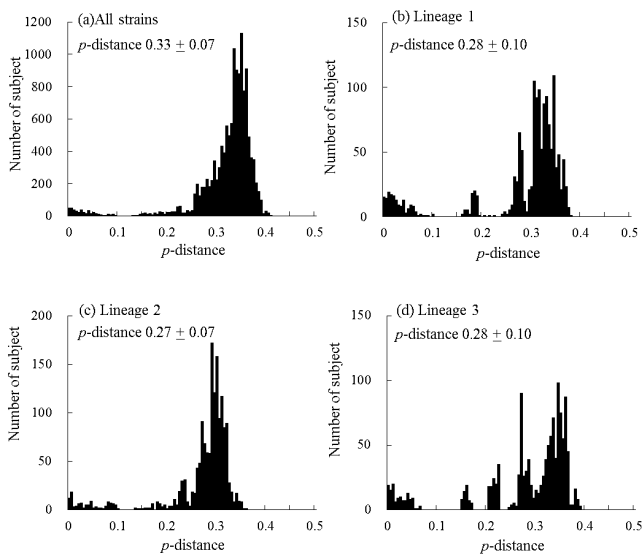


図6 VP3 遺伝子の  $p$ -distance

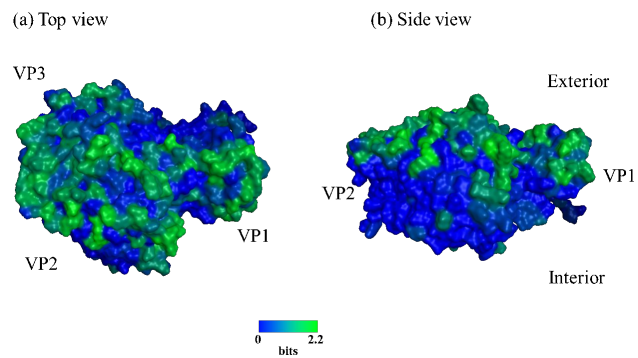


図7 VP1, VP2 および VP3 タンパク質の 3次元構造モデル

## 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<sup>®</sup> (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<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<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。

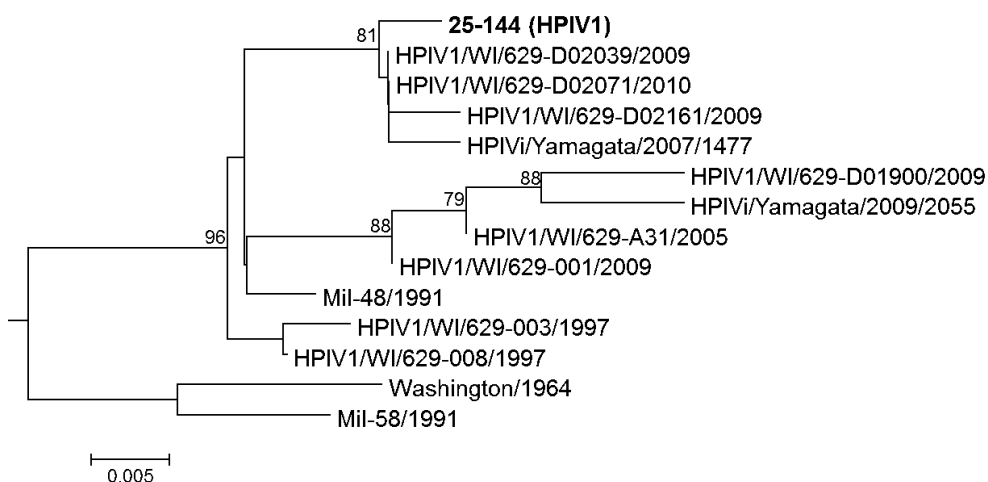


図1 エンテロウイルス疑い症例から検出されたパラインフルエンザウイルス1型

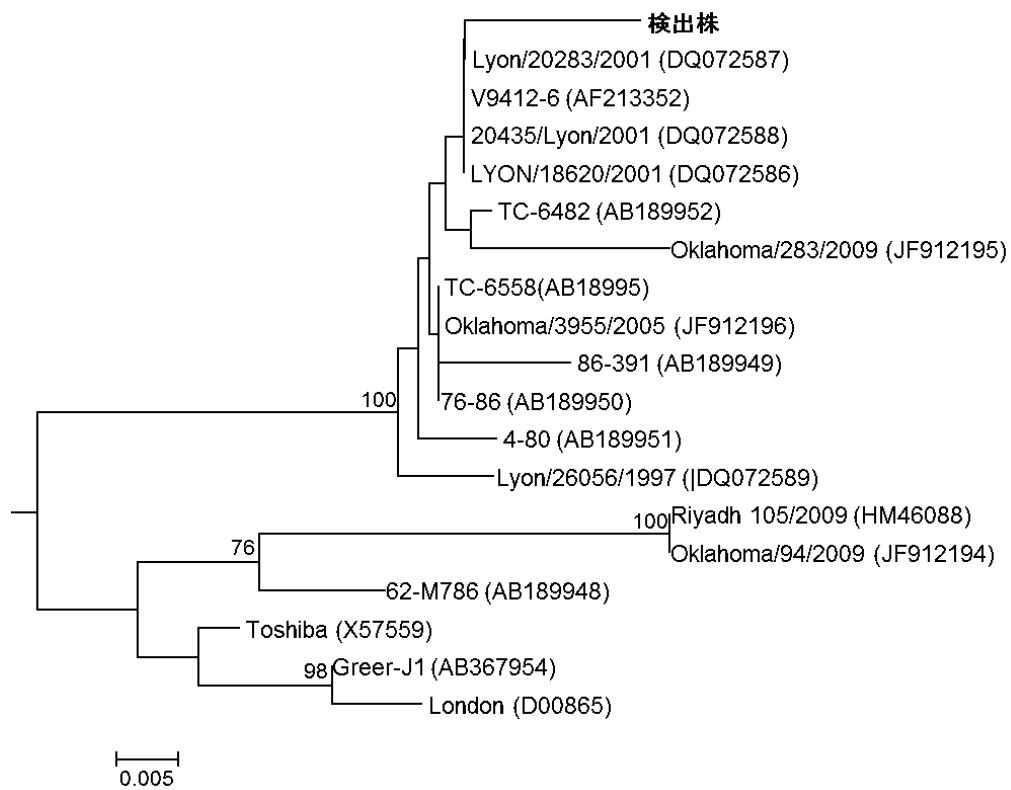


図2 脳症患者から検出されたパラインフルエンザウイルス2型

「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) を見ることににより、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

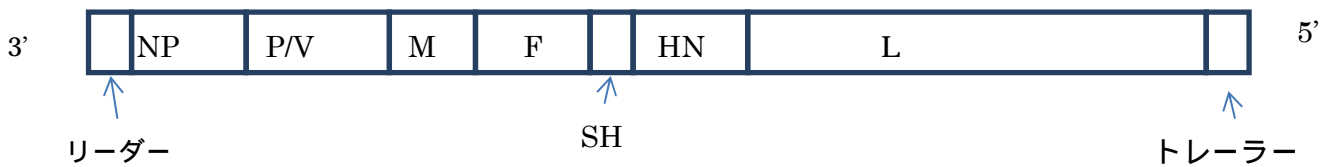


図1 HPIV4のゲノム構造

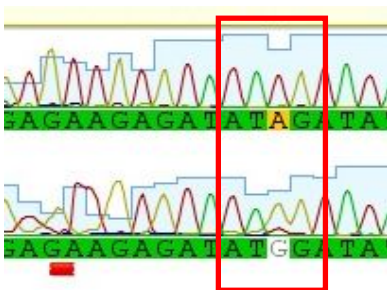


図2 サンガー法のデータ



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)	TGCATTTCCACACTTGAAACGAGCG	4,871
PCR-R-primer(13900-R)	ACGCGTGTCTTAGAAAGTTCGTACG	
PCR-F-primer(13533-F)	TGGGCTCCTTTTGTGCATGGTAGGGG	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)	GGGCTCCTTTGTACATGGTAGGGG	3639
PCR-R-primer(17165-R)	TGGTGTGGCCTTAGTCCTTATCC	

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	GGTTGCACTCTCTTTGTCGGA	362
4a-DA_HPIV4c_39R_C	ACCAAGGGGAGAAGAGATAWGAAA	

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	CAAATCTCTRGATAATGCC	
4b-DA_HPIV4c_37Fe	TGGGAACAATTAATACAYCAA	682
4b-DA_HPIV4c_38Re_C	CGTTTGAATCRTTAACTGG	
4b-DA_HPIV4c_38Fe	GGATGTACYCTYTTCGTTGGA	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スで検査が可能か: 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) により総り

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十万里ドを越えた。

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、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、検体からの DNA あるいは RNA の抽出、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、データ解析の 3 つの工程で実施される。昨年度は、<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>及び<sup>3)</sup>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、小淵正次、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	GTGGGATTA ACTCCAGGAGG	-	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

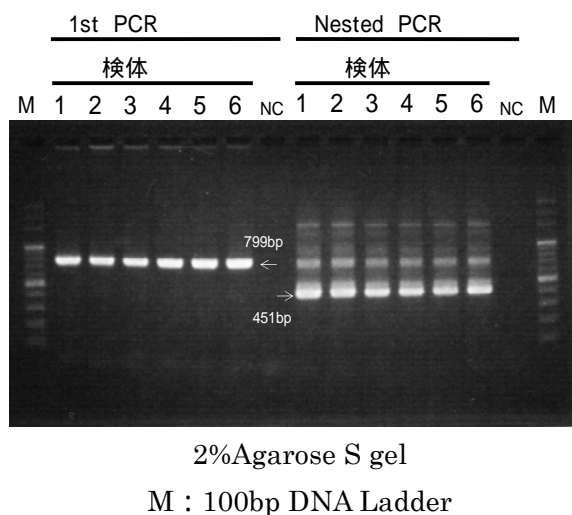


図 1 . SaV GV.2 特異的コンベンショナル PCR 法により得られた電気泳動像

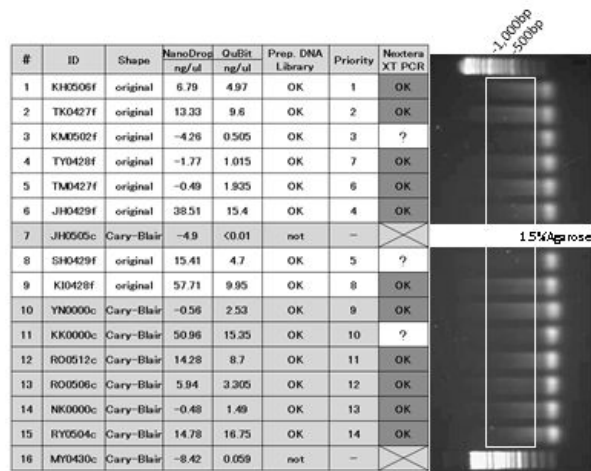


図 2 . 便 DNA の定量と NexteraXT によるライブラリの検定

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

	Spicimen 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	

「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、 $1.4 \times 10^5 \sim 9.7 \times 10^5$  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

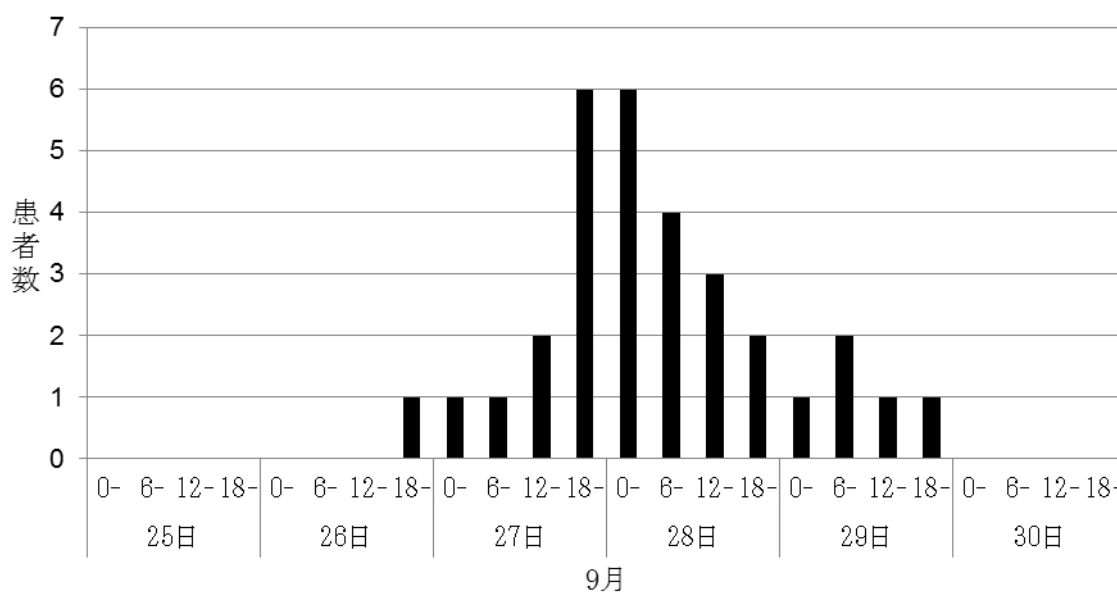


表 解析結果

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 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、通常の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、通常の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 シーケンサー MiSeq（illumina）を用い 250bp×2 でシーケンスを行なった。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

代シーケンサーで得られた配列からヒトゲノム情報を解析開始前の時点で削除した。具体的には、ヒトゲノム配列 (hs\_ref\_GRCh37) を対象にして Bwa mapping によりヒト配列に該当する解読リードを削除した。残る解読リードを病原体候補として megablast - nt および blastx- nr 相同性検索を行い、臨床所見に該当する病原体候補を抽出した。以上の結果、解析対象とした限定された配列情報のみから個人を特定することや、生活習慣病などの個人特有のリスク因子を特定することはできない。

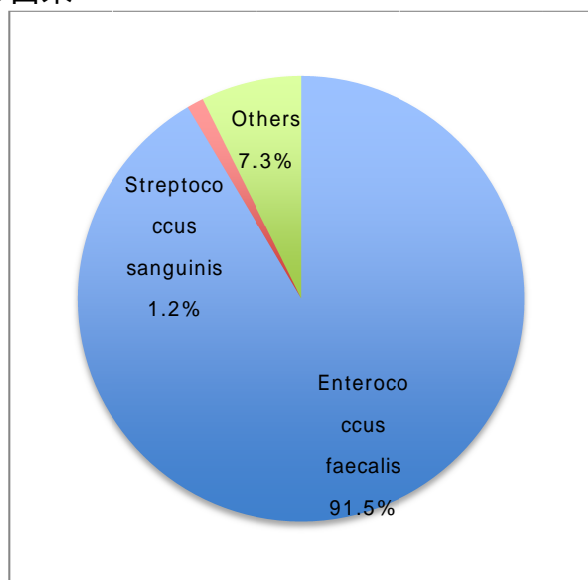
### C. 研究結果

#### 症例 1

70 歳男性、他院にて左下蜂窩織炎の診断で入院し、セファロスポリン系薬にて 1 ヶ月加療された症例。その後、原因不明の発熱、炎症反応上昇および腰痛が出現し、臨床経過および画像所見より、化膿性椎体炎と診断され、原因菌検索目的で穿刺術が施行された。穿刺吸引物および血液培養からも *Enterococcus faecalis* が検出された。

穿刺吸引物について DNA-seq を実施したところ、合計 3,701,992 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 8,553 本 (0.23%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、7,814 本 (91.4%) が *E. faecalis* 由来のリードであった (図 1)。

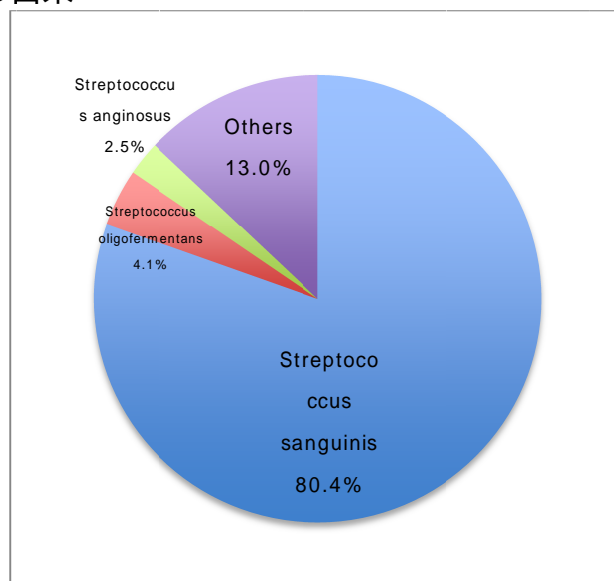
図 1. 症例 1 の Bacteria に占めるリードの由来



#### 症例 2

患者背景は不明。感染性心内膜炎に対し、人工弁置換術が施行された。適切された疣贅の培養検査は陰性であった。その疣贅について DNA-seq を実施したところ、合計 4,616,658 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 56,471 本 (1.31%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、45,425 本 (80.4%) が *Streptococcus sanguinis* 由来のリードであった (図 2)。

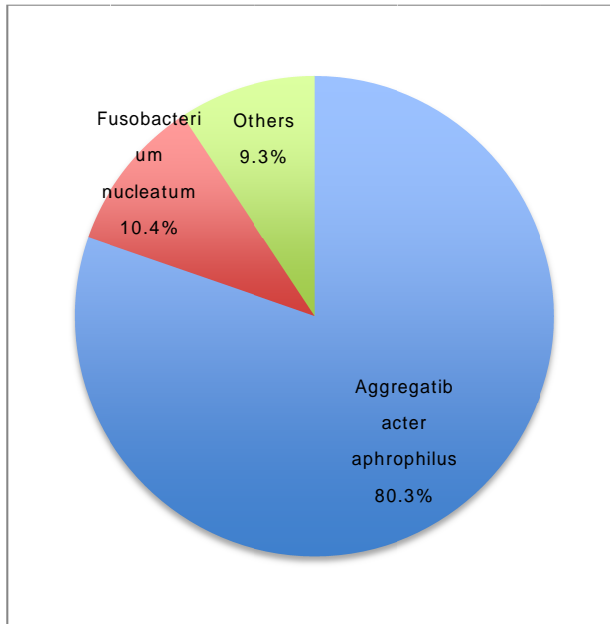
図 2. 症例 2 の Bacteria に占めるリードの由来



#### 症例 3

39 歳男性、免疫不全等重症感染症のリスク因子がないにもかかわらず、右基底核部脳膿瘍を発症した。抗菌薬投与前に採取した血液培養は陰性であった。アンピシリンおよびセフトリアキソンの投与にも関わらず膿瘍が拡大したためドレナージが施行された。膿汁の培養検査は陰性であった。その膿汁について DNA-seq を実施したところ、合計 7,522,354 本のリードが取得され、そのうち Bacteria 由来のリードは 4,146 本 (0.06%) であった。Bacteria 由来のリードのうち、3,278 本 (79.1%) が *Aggregatibacter aphrophilus*、423 本 (10.2%) が *Fusobacterium nucleatum* 由来のリードであった (図 3)。

図3. 症例3のBacteriaに占めるリードの由来



#### 症例4

生後1ヶ月男児、38 台の稽留熱を認め、全身状態および末梢循環不全が強く、敗血症症状を認めた。ウイルス性髄膜炎および脳炎が疑われ、各種臨床検査データを考慮して *Parechovirus* 感染症と臨床症状から診断した。

髄液と血清について、RNA-seq ライブラリ (cDNA ライブラリ) を作成したが、髄液についてはライブラリが不良であったため血清由来ライブラリのみ解読を行なった。Total 20,285,474 本のリードが取得され、そのうち Viruses 由来のリードは 883 本 (0.004%) であった。そのうち、Human parechovirus 3 (HPeV-3) 由来のリードが 55 本 (6.23%) 検出された。その他、臨床的に有意である Viruses 由来のリードは検出されなかった。

#### D. 考察

本検討のうち、症例4以外は長期に適切な抗菌薬の投与が必要な症例であった。一般に、検体採取前に抗菌薬が先行投与されている場合には培養検査が陰性となるケースが多く、起因微生物が不明となるために広域抗菌薬を長期投与せざるを得ない。

症例1では、椎体穿刺吸引物の培養検査によって、化膿性椎体炎の起因菌として *E. faecalis* が分離されており、同一検体について DNA-seq を行なったところ、同菌種が検出されたことから、本手法は臨床材料から起因菌として想定される細菌を確実に検出可能であることが示された。

症例2および3において、各検体についての培養検査が陰性であったが、細菌をターゲットに DNA-seq を実施したことで起因菌の検出が可能であった。また、症例3においては *A. aphrophilus* および *F. nucleatum* の混合感染の可能性が示唆され、網羅的解読の有用性が示された。

これらの症例は、本解析により起因菌が判明したことで、その後の抗菌薬選択の一助となった。

症例4は臨床的に *Parechovirus* 感染症が疑われており、患者血清についての RNA-seq により HPeV-3 の存在が証明された。当時、本邦では *Human parechovirus* のなかでも3型が流行しており、RNA-seq による検査結果においても HPeV-3 と相同性の高いリードが検出され、疫学情報とも一致した。取得リード数が十分であれば、臨床材料の RNA-seq は起因ウイルスの型別も可能であることが示唆された。

#### E. 結論

抗菌薬先行投与等のため培養検査が陰性であった原因菌不明症例について、次世代シーケンサーを用いた病原体網羅的検索は、抗菌薬選択等の観点で臨床への貢献が可能であった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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

**分担研究課題：不明症例の病理検体からの新規病原体検索**

研究分担者 片野晴隆 国立感染症研究所・感染病理部 室長

研究要旨

臨床で感染症が疑われながら、病原体が同定できず、原因が明らかでない疾患の病理検体から定量的 PCR、および、次世代シーケンサーを用いて、既知、及び、未知の病原体遺伝子を検出することを目的とした。2014年に国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた113例の不明疾患症例につき、170種類のウイルスを同時に網羅的に検出可能な定量的 PCR (multivirus real-time PCR) を用い、原因ウイルスの同定を試みた。その結果、4例(3.5%)で原因ウイルスが同定された。また、multivirus real-time PCR でも有意なウイルスが検出されなかった3症例の病理検体につき、次世代シーケンサーによる解析を行ったが、有意なウイルスは検出されなかった。一方、われわれが2012年に心筋炎患者から次世代シーケンサーを用いて検出した trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV) について、血清抗体を検出する ELISA を確立し、日本人における血清疫学を明らかにした。健常者の6割以上が血清中に抗 TSV 抗体陽性であり、TSV が日本国内に広く感染しているウイルスであることが明らかになった。

研究協力者:

福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）

黒田 誠、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）

李 天成、脇田隆字（国立感染症研究所・ウイルス第2部）

鈴木哲朗（浜松医科大学）

梁 明秀（横浜市大医学部）

A. 研究目的

感染症が疑われ、かつ、原因微生物の同定ができない検体の解析法として、次世代シーケンサーによる全核酸遺伝子の解読は、不明病原体の解明に極めて有力なツールである。次世代シーケンサーは2000年代前半に開発されてから急速に広まりつつあり、その有用性に疑いの余地はないが、現在でも、1サンプルあたりに高額なランニングコストがかかる上、遺伝子情報の解読、解析には高度なバイオインフォマティクスの知識と技術が必要であり、一つのサンプルから微生物の同定までに至る過程は

決して容易なものではない。簡易な装置の開発も進められているが、その普及にはまだ時間を要し、現在ではすべての検体で次世代シーケンサーの解析を行うことは現実的でない。しかし、どのような症例を次世代シーケンサーで解析すべきかについて、その適応に関する基準や、標準的な考え方がないのが現状である。

われわれは多くの感染症疑いの不明疾患の病理検体を扱ってきた経験から、臨床検体において、次世代シーケンサーの解析に適するかどうかの基準を、(1)十分な微生物学的検索がなされているが、それでもなおかつ、原因不明であること、(2)患者の状態、症状、検査値などの十分な臨床情報が得られていること、(3)サンプルの種類、状態、量が次世代シーケンサーの適応となること、(4)病変部の病理組織サンプルなど、検索結果の確認が取れる材料が存在すること、または、検索結果がすぐに治療方針に反映できるような臨床体制があり、臨床側と綿密な情報交換が可能な状況にあること、などの要件から、総合的に判断している。

国立感染症研究所感染病理部には臨床で感染症

が疑われながら、医療機関や地方衛生研究所で病原体が同定できなかった病理検体がコンサルテーションとして送られてきている。われわれはこれらの症例につき、組織学的検索や免疫組織化学、PCRなど、様々な手法を駆使して、病原微生物の核酸や蛋白の同定を試みている。感染病理部では、160種類以上のウイルスを網羅的に検出できる定量的 PCR 法 (multivirus real-time PCR) を開発し、これらの疾患の原因の解明に努めているが、残念ながら 8 割から 9 割は原因不明のままである。本研究では感染病理部に送付された原因不明の感染症疾患の病理検体のうち、上記の方法で原因病原体の同定に至らなかった症例から、次世代シーケンサーで全遺伝子を解読する症例を選定し、さらに実際に次世代シーケンサーの解析を行うことで、次世代シーケンサー解析の適応を検討した。

さらに、われわれが 2012 年に 0 歳児の心筋炎サンプルから検出された trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV) について、血清中の抗体を検出する ELISA の系を立ち上げ、日本人における血清疫学を調査した。TSV は 2010 年にヨーロッパで発見された新しいヒトポリオーマウイルスであり、8 番目に発見されたヒトポリオーマウイルスであることからヒトポリオーマウイルス 8 (human polyomavirus 8, HPyV8) とも呼ばれる。trichodysplasia-spinulosa 以外の疾患との関連は知られておらず、心筋炎検体から検出されたとする報告もこれが初めてである。今年度は、TSV 感染と他の疾患との関連を調査するツールとして ELISA を開発し、日本人健常者における抗 TSV 抗体陽性率を調査した。

## B . 研究方法

### 1 ) 臨床検体

全国の医療機関または地方衛生研究所から感染病理部に送付された不明感染症疾患の病理検体を使用した。これにはホルマリン固定パラフィン包埋標本が含まれる。血清疫学に用いた血清は国立感染症研究所血清銀行に保存してある血清サンプル 1,000 人分を用いた。

### 2 ) 核酸抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋標本からの核酸抽出は Qiagen DNeasy FFPE kit (DNA) および Invitrogen PureLink FFPE RNA extraction kit (RNA) を用いた。凍結サンプル、髄液、血清、鼻咽頭ぬぐい液、尿、便等からの核酸抽出は Qiagen DNeasy kit

(DNA), RNeasy Plus kit (RNA) を用いた。

### 3 ) Real-time PCR によるウイルスの網羅的検出法

本研究室で独自に開発した、ヒトに病原性を持つと考えられる 170 種類以上のウイルスを 96 穴プレート上で一度に検出できる real-time (RT-)PCR システムにより RNA および DNA サンプルからウイルスの検出を試みた (Katano H et al. J Med Virol 2011)。個々のウイルスを検出する定量的 PCR は MX3005P (ストラタジーン社)、または ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて行った。

### 4 ) 次世代シーケンサーによる遺伝子解析 (研究代表者 黒田らによる):

RNA ~10 ng をもとに ScriptSeq V2 RNA-seq library preparation kit にて網羅配列解読用のライブラリーを作成した。調整したライブラリーを ベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq にて 150 mer x 150 mer のペアエンド法で解読した。検出されたリードは megablast 法にて NCBI nt データベースに配列照合し、MEGAN 5 にて各リードを生物種ごとに分類した。ヒト遺伝子を除き、既知のウイルスゲノムに相同性のある配列を抽出した。

### 5 ) TSV-ELISA の開発と血清疫学:

TSV の VP1 を、組換え Baculovirus 発現システムによるタンパク合成し、virus like particle (VLP) を作成した (研究協力者 季らによる)。ELISA は TSV の VLP を抗原に、ヒト血清を 1 次抗体として、2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用い、p-ニトロフェニルホスファートで発色し、ELISA リーダーで吸光度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究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済である (H25/7/30 No.417、および、H26/8/4 No.511)。試料提供者の個人情報は、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 がつけられた状態で感染研に送付される。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、検査実施者が試料提供者個人を特定することはできない。血清疫学に用いた血清銀行の血清も、すべて匿名化されている。

## C . 研究結果

### 1 ) 感染病理部レファレンス症例における既知、または未知の病原体遺伝子の検索

2014 年に感染病理部に不明感染症例として送ら

れてきた病理検体のうち、multivirus real-time PCR で解析した症例は 113 例であり、このうちの 4 例 (3.5%) で、本検査系により病原ウイルスを同定することができた (表 1、研究協力者、福本、佐藤、高橋、長谷川ら)。検索対象は脳炎、心筋炎、肺炎などの検体であり、検出されたウイルスの内訳はインフルエンザウイルス 1 例、ヒトパピローマウイルス 2 例、単純ヘルペスウイルス 1 型 1 例であった。ヒトパピローマウイルス例では単一の病変部から複数のタイプのヒトパピローマウイルスが検出された。また、インフルエンザウイルス感染後の肺炎とされる剖検例から単純ヘルペスウイルス 1 型が検出される例もあり、単純ヘルペスウイルス 1 型感染は病理組織における免疫組織学的検討でも確認された。

さらに、multivirus real-time PCR で有意なウイルスが検出されなかった症例 3 例と HHV-6 が関連した薬剤過敏症の症例について、病理検体から抽出した RNA を次世代シーケンサーで解析した (表 2)。原因不明例では、有意なウイルスを検出することができなかったが、HHV-6 が関連した薬剤過敏症の症例では HHV-6 の mRNA の発現プロファイルの解析が可能であり、現在も解析中である。

## 2) TSV の血清疫学

われわれは 0 歳児の心筋炎剖検症例から次世代シーケンサーの解析により TSV の遺伝子断片を検出し、昨年度には、この心筋の凍結検体から TSV の全長遺伝子を増幅することに成功し、その配列決定を行った (研究協力者、福本)。5.2 kbp におよぶ TSV の全長遺伝子配列は、既報告の 2 つの TSV と 99 % の相同性があり、TSV-TMC 株 (Tokyo Myocarditis が由来) として GenBank に登録した (accession no. AB873001)。TSV-TMC 株は世界で 3 番目に報告された TSV の全長遺伝子配列となった。

TSV はヒトから見つかった 8 番目のポリオーマウイルスとして human polyomavirus 8 (HPyV8) ともいわれる。元々発見された trichodysplasia-spinulosa という皮膚のまれな疾患以外では疾患との関連は報告されておらず、欧州における血清疫学では健常者の 7 割が抗体陽性とされる。しかし、日本では trichodysplasia-spinulosa の報告例はなく、日本人における血清疫学も知られていないことから、TSV に対する ELISA を立ち上げ、日本人における血清疫学を調査した (研究協力者、福本、李、脇田、鈴木)。日本人の血清 1,000 人分を調査したところ、

抗体陽性者は 629 人であり、抗体陽性率は 62.9% であった。抗体陽性率の性別、世代、地域による差は認められなかった。年齢別には 5 歳までに約 5 割、10 歳までに約 7 割が感染しており、その後も徐々に抗体陽性率は上昇し、60 歳代では約 9 割が抗体陽性であった。抗体価は感染直後の 10 歳代で最も高く、その後、高齢になるまで、徐々に減衰するが、70 歳代以上の群で再び上昇する。このことは 70 歳代以上で TSV が再活性化する可能性を示唆する。一般にポリオーマウイルスの VP1 は異なるポリオーマウイルス間で遺伝子の相同性が高く、BKV と JCV では血清が交差反応することが知られているが、本研究で立ち上げた TSV-ELISA では近似の Merkel cell polyomavirus, BKV とは交差反応性が無いことが確認された。

## D. 考察

次世代シーケンサーは不明感染症例における原因微生物の同定に極めて有効なツールであることは間違いないが、1 検体にかかるコストが高額な上、高額な機器とバイオインフォマティクスに長けた技術者が必要であるなど、臨床検体を日常的に検索するにはまだ多くの問題がある。不明症例とされている症例の中には、軽症のため、十分な微生物検査がなされる前に軽快し、原因不明とされた症例もあれば、重症例でさまざまな微生物検査がなされたにもかかわらず、原因が不明とされている症例もあるであろう。一般的に不明感染症例の定義は存在しないばかりか、不明感染症例の、どの検体を次世代シーケンサーの解析を行うかについての一般的な選択基準は存在しない。multivirus real-time PCR は次世代シーケンサーよりも手軽に、低コストで、多くのウイルスを網羅的にスクリーニングできるシステムであり、次世代シーケンサーに進む前の検査としては有効なスクリーニング法と考えられる。われわれの使用している multivirus real-time PCR では 170 種類を超えるウイルスの網羅的検索が可能であるが、症状や部位別、サンプルごとに検出されるウイルスはある程度絞られることから、目的ごとに、標的ウイルス数を削減したものが、今後、地方衛研などで次世代シーケンサーを検討する前のスクリーニング法としては現実的であろう。

TSV の血清疫学では日本人成人の約 7 割が TSV に対する血清抗体を保持していることが判明し、本ウイルスが日本人の間で広く感染していることが分かった。この数値は既に報告されている欧州や豪

州の検討結果とほぼ同じであり、10歳までに7割が抗体陽性であることは、多くの人で10歳までに初感染が成立していることを示している。他のウイルス感染症と同様に血清抗体価は初感染後、10歳代をピークとして徐々に減衰し、70歳以上でもう一度、抗体価の上昇が見られる。これは、老齢期にTSVが再活性化している可能性を示唆するものである。本検索は健常者血清を対象とした研究であるために、疾患との新たな関連が明らかになるものではない。健常者における感染率は欧州と同様であるにもかかわらず、trichodysplasia-spinulosaが日本人ではまったく報告がない点も疑問である。また、初感染に出現するIgMについては今回の検索では捉えることはできなかった。TSVの初感染がどのような病態と関連するか、興味深い点であり、小児を中心に多くの血清を検索する必要がある。さらにTSVに対するモノクローナル抗体(研究協力者 梁ら)を用い、保存病理検体を検討し、TSVと新たな疾患との関連を明らかにできるよう、検索を続けていく。

#### E. 結論

不明感染症例の病理組織検体を対象に、multivirus real-time PCRを用い、原因ウイルスの同定を試みた。本年度は、検索した症例の3.5%で原因ウイルスを同定した。Multivirus real-time PCRは次世代シーケンサーを行う検体のスクリーニング法として有効な手段である。4症例の病理検体につき、次世代シーケンサーでの解析を行ったが、新たに有意なウイルスは検出されなかった。心筋炎症例から次世代シーケンサーで検出したTSVについて、血清抗体を検出するELISAを立ち上げ、日本人健常者における血清疫学を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

(1) Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita

T, Katano H: Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl. Int J Clin Exp Pathol 2014. 7:5308-5312.

(2) Mine S, Suzuki K, Sato Y, Fukumoto H, Kataoka M, Inoue N, Ohbayashi C, Hasegawa H, Sata T, Fukayama M, Katano H: Evidence for human herpesvirus-6B infection of regulatory T-cells in acute systemic lymphadenitis in an immunocompetent adult with the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: A case report. J Clin Virol 2014. 448-452.

##### 2) 学会発表

(1) 福本 瞳、都築慎也、佐藤典子、峰 宗太郎、望月 眞、川名誠司、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆。日本人からの Trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus のクローニング。第 113 回 日本皮膚科学会総会。京都。2014.5.

(2) Katano H, Hishima T, Sakamoto K, Uehara T, Sekizuka T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M. Profiling microRNA in Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disorders with deep sequencing and real-time RT-PCR. International Herpesvirus Workshop, Kobe, 2014.7.

(3) 高橋健太、福本 瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、長谷川秀樹、片野晴隆。不明脳炎症例の病理検体における原因ウイルスの網羅的検索。第 62 回日本ウイルス学会学術総会。横浜。2014.11.

(4) 福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰宗太郎、保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆。網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用。第 62 回日本ウイルス学会学術総会。横浜。2014.11.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし



表1 2014年にMultivirus real-time PCRで検索した病理検体の結果。HPV: human papillomavirus, HSV: herpes simplex virus.

臨床診断	検索症例数	ウイルス検出症例数	検出ウイルス
脳炎、髄膜炎	9	0	-
心筋炎	39	0	-
肺炎	31	2	HSV, influenza virus
扁桃炎	22	0	-
その他	12	2	HPV
<b>合計</b>	<b>113</b>	<b>4</b>	<b>-</b>

表2 2014年に次世代シーケンサーの解析を行った病理検体。HHV6: human herpesvirus 6.

No.	疾患名	年齢、性別	組織	結果
1	HHV-6関連薬剤過敏症	50歳代 男性	剖検リンパ節	多量のHHV-6 mRNAを解読 HHV-6 mRNAの発現profileを解析中
2	原因不明亜急性壊死性 リンパ節炎	30歳代 男性	リンパ節生検	有意な微生物遺伝子は検出されない。
3	心筋炎	60歳代 男性	剖検心臓	有意な微生物遺伝子は検出されない。
4	心筋炎	0歳 男性	剖検心臓	有意な微生物遺伝子は検出されない。

表3 日本人健常者におけるTSVの血清疫学。

検体	陽性数/サンプル数 (%)	オッズ比 (95% CI) *	P**
<b>合計</b>	<b>629/1,000 (62.2%)</b>		
<b>性別</b>			
男	327/500 (65.4%)	1	-
女	302/500 (60.4%)	0.807 (0.624-1.043)	0.102
<b>世代</b>			
1980年に採集された血清	315/500 (63.0%)	1	-
2012年に採集された血清	314/500 (62.8%)	0.991 (0.767-1.282)	0.948
<b>地域</b>			
東北	106/163 (65.0%)	1	-
関東	108/161 (67.1%)	1.096 (0.692-1.736)	0.697
中部	122/183 (66.7%)	1.075 (0.689-1.678)	0.749
近畿	57/96 (59.3%)	0.786 (0.468-1.321)	0.363
中国	103/160 (64.4%)	0.972 (0.616-1.534)	0.902
四国	38/60 (63.3%)	0.929 (0.502-1.720)	0.814
九州	95/177 (53.7%)	0.623 (0.402-0.964)	0.033

\*オッズ比は性別では男性、世代では1980年、地域では東北に対する調整オッズ比を示す。

\*\* P値はカイ2乗検定

## 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）

### 分担研究年度終了報告書

#### 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

～病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による抗原解析と新規病原体検査法の開発

研究分担者	梁 明秀	横浜市立大学医学部微生物学
研究協力者	松永智子	横浜市立大学医学部微生物学

**研究要旨** 近年、次世代核酸シーケンサを用いた新興・再興感染症に対するメタゲノム解析が進歩し、新たな病原体の同定や病因の解明が進んでいる。本研究プロジェクトでは、網羅遺伝子解析を基盤とした病原体のプロテオーム解析を実施し、それを基盤とした病原体に対する新規検査診断法の開発を目指している。網羅的遺伝子情報に基づくウイルス抗原の解析やウイルスタンパク質の機能解析等について、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたプロテオミクスを活用する。本年度は昨年度に作製した Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) の VP1 タンパク質に対するモノクローナル抗体の性状解析を実施した。コムギ無細胞系を用いて、VP1 の欠失変異体を複数作製し抗体認識領域を探索したところ、本抗体は VP1 のカルボキシル末端領域を認識することが判明した。また、複数のポリオーマウイルスの VP1 タンパク質を作製し、本抗体の交差反応性について検証した結果、本抗体は TSV-VP1 のみを特異的に認識することが判明した。本抗体を用いることで TSV に対する新たな検査法や診断法の開発に結びつくものと考えられる。

#### A . 研究目的

感染症の疑いのある不明疾患やバイオテロ、新興・再興感染症などによるアウトブレイク対策のための迅速・網羅的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が重要である。一方で、感染症の疑いのある不明疾患等のための迅速・網羅的病原体解析法として、ウイルス抗原の検出や血清中の抗ウイルス抗体の測定法を整備することが必要となる。次世代シーケンシングの進歩に伴ってメタゲノム研究の分野は大きく発展し、不明感染症の病原体由来のゲノム断片を多数検出することが可能である。しかしながら、疾患検体に存在するゲノム断片のみでは、当該病原体の疾患病因との関与について確定することは難しく、核酸検査と平行して疾患臓器における病原体抗原の存在および宿主血清中の病原体特異的抗体の存在を証明すべきである。そのためには、病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による抗原解析と新規病原体検査法の開発が必須である。

近年、新興・再興感染症に対する抗原・抗体診断法の開発が進んでいる。しかしながら、従来の手法は、大腸菌や培養細胞への遺伝子導入によりウイルスタンパク質の合成が基盤であり、細胞毒性が強く、かつ可溶性の低いウイルス抗原タンパク質の作製には不向きであった。今回、我々は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて新規病原体の可溶化全長タンパク質を作製し、これを抗原として用いることで、免疫学的診断に利用可能な高品質のモノクローナル抗体の作製を行った。

#### B . 研究方法

##### 1.コムギ無細胞系による TSV ウイルス VP1 タンパク質の合成

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV)がコードする VP1 遺伝子を PCR 法を用いて増幅し、無細胞タンパク質発現ベクター pEU-bls-S1 (bls; biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) に導入した。作製した pEU ベクタ

ーを鋳型に SPU primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1 $\mu$ l (~ 50ng/ $\mu$ l) および 終濃度 0.5 $\mu$ M Biotin を加えることにより行った。免疫用抗原の作製においては、His タグを付加した VP1 タンパク質を、ウイルスタンパク質の可溶化を亢進させるために界面活性剤である Brij35 (0.5%) 存在下にて合成後、Ni-sepharose ビーズにタンパク質を吸着させた。カラムを 8 M の尿素を含む洗浄液にて 2 回洗浄した後、500mM イミダゾールバッファーを用いて精製タンパク質を抽出した。

## 2. パラフィン組織免疫染色

パラフィン組織スライドをキシレンの入った染色瓶に 4 回各 5 分間浸漬することで、完全にパラフィンを溶解した。次に、100%および 70%エタノールに 4 回各 5 分間浸漬し、その後、純水で 3 回各 5 分間洗浄し水和させた。過酸化水素水および 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で処理後、Normal horse serum でブロッキングを行い、抗 TSV-VP1 抗体を 8 時間処理させた。洗浄後、ビオチン標識 2 次抗体を処理後、ジアミノベンジジン (DAB) を用いて発色後、封入を行った。

## 3. ELISA 法

96 well plate に終濃度で 50 ng/well の抗原を一晩コートした。反応後、バッファー液を除きブロッキング剤を加えて室温で 1 時間静置した。その後 PBS で 3 回洗浄後、各倍希釈したハイブリドーマ上清を加え室温で 1 時間反応させた。次に PBS で 3 回洗浄後 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。これを PBS で

3 回洗浄後発色基質を加え、30 分後 1 N 硫酸で反応を停止させマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒト検体を使用した実験を実施していないが、臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者(感染者)の同意を得る予定である。

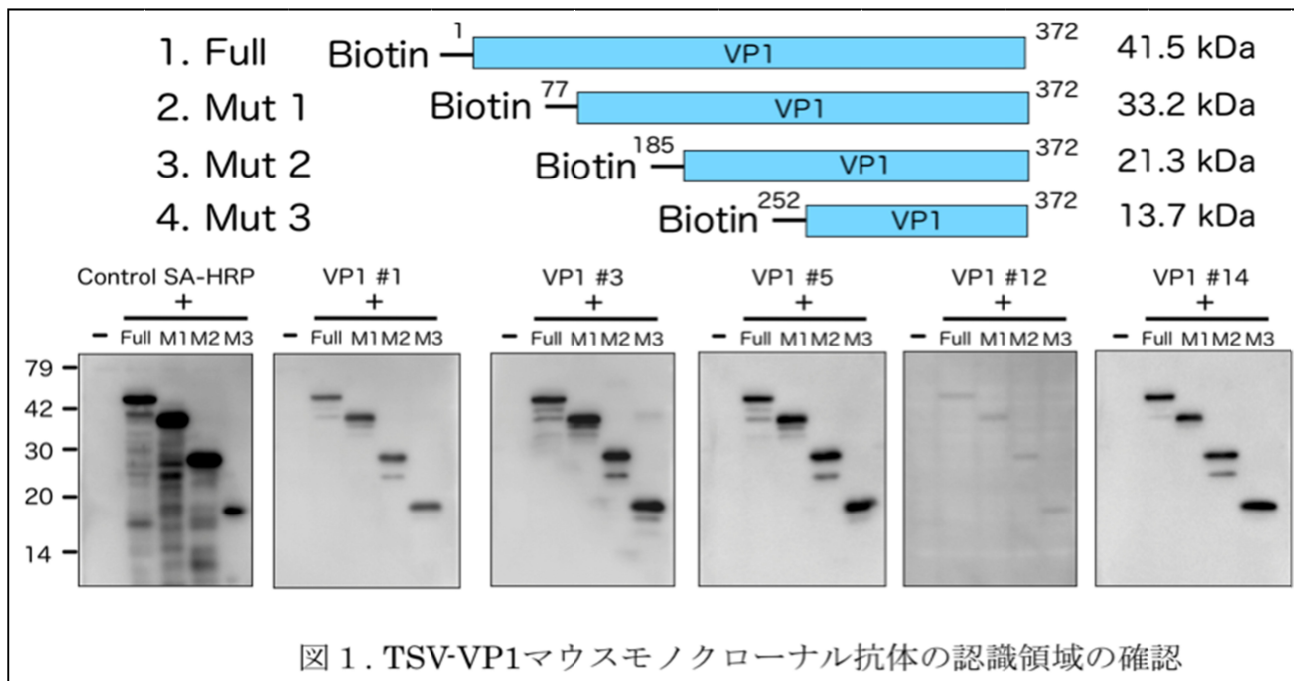
## C . 研究結果

### 1.ポリオーマウイルス VP1 タンパク質の合成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した TSV-VP1, MSPyV-VP1, BKPyV-VP1, JCPyV-VP1 タンパク質は、概ね不溶化タンパク質であった。しかしながら、翻訳反応液中に界面活性剤の Brij35 またはリポソームを添加することで、可溶化率が顕著に亢進した。Brij 35 および ZnCl<sub>2</sub> 添加により可溶化タンパク質として合成が確認された。これらの全長タンパク質を活用し、抗体の性能解析を実施した。

### 2.TSV-VP1 モノクローナル抗体のエピトープ解析

上記と同様の方法にて作製した TSV-VP1 欠損変異体を 3 種を用いてウエスタンブロット法にてエピトープ解析を実施した。作製した抗原は、VP1 全長(1-372)、変異体 1(77-372)、変異体 2(185-372)、変異体 3(252-372)である。作製した抗体はこれらのすべての抗原タンパク質を検出したことから、本抗体は VP1 の C 末端領域を認識していることが判明した(図 1)。



### 3. TSV-VP1 モノクローナル抗体の特異性の解析

次に本抗体の特異性について、関連するポリオーマウイルスの VP1 タンパク質への交差反応性により検証した。遺伝子解析により TSV に比較的近縁であるとかんがえられる、MSPyV、BKPyV、JCPyV の VP1 タンパク質を TSV-VP1 とともに SDS-PAGE にて泳動し、ウエスタンブロットにて反応性を確認した。その結果、本抗体は TSV-VP1 のみに特異的に反応することが明らかとなった。現在本抗体の免疫組織化学染色に応用可能かどうかについて検討中である。

### 4. TSV-VP1 モノクローナル抗体を用いたパラフィン組織免疫染色

パラフィン包埋された Trichodysplasia spinulosa 組織検体を用いて、免疫組織化学染色を行った。その結果、病変部の毛包上皮細胞および表皮基底層の一部でのみ染色シグナルが認められた。現在、抗原消化法を用いて、これらのシグナルの特異性について検証中である。

### D. 考察

本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成した可溶性 TSV-VP1 タンパク質を駆使し、世界に先駆けて抗 TSV-VP1 抗体を作製し、その性状解析を実施した。また、本抗体を用いて Trichodysplasia spinulosa 組織検体の免疫染色が実施できた。本ウイルスを活用することで、TSV の診断のみならず、本ウイルスの病原性発現機構についてさらに解析が進むものと考えられる。

### E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成システムを活用して作製した全長 TSV-VP1 タンパク質の精製に成功した。また、本抗原に対するモノクローナル抗体を作製した。本抗体は TSV-VP1 の C 末端を認識し、他のポリオーマウイルスの VP1 とは交差反応を示さないことが明らかになった。免疫組織化学に有用な抗体が取得できたことで、本ウイルスの病原性や疾患形成への役割について今後は解析が進むことが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kimura H, Ryo A: Pathophysiology and epidemiology of virus-induced asthma. *Frontiers in microbiology* 2014, 5:562.
2. 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 Oct 2;28C:183-191.
3. Satoko Matsunaga, Shiho Kawakami, Akiko Okayama, Hiroyuki Tsukagoshi, Ayumi Kudoh, Izumi Matsuo, Yuki Matsushima, Hideaki Shimizu, Nobuhiko Okabe, Hisashi Hirano, Naoki Yamamoto, Hirokazu Kimura, Akihide Ryo. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody. *Frontiers in Microbiology.* 2014 Apr 18;5:208.

### 2. 学会発表等

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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	2015
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.

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.	5	410.	2014
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.	69(2)	206-10.	2014
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.	67(6).	441-6	2014

Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita T, Katano H:	Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl.	Int J Clin Exp Pathol	7	5308-5312.	2014.
Mine S, Suzuki K, Sato Y, Fukumoto H, Kataoka M, Inoue N, Ohbayashi C, Hasegawa H, Sata T, Fukayama M, Katano H:	Evidence for human herpesvirus-6B infection of regulatory T-cells in acute systemic lymphadenitis in an immunocompetent adult with the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: A case report.	J Clin Virol	61(3)	448-452.	2014.
Kimura H, Ryo A:	Pathophysiology and epidemiology of virus-induced asthma.	<i>Frontiers in microbiology</i>	5	562.	2014
Satoko Matsunaga, Shiho Kawakami, Akiko Okayama, Hiroyuki Tsukagoshi, Ayumi Kudoh, Izumi Matsuo, Yuki Matsushima, Hideaki Shimizu, Nobuhiko Okabe, Hisashi Hirano, Naoki Yamamoto, Hirokazu Kimura, Akihideo Ryo.	Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody.	Frontiers in Microbiology	5	208.	2014



<p>Sekizuka T, Kai M, Nakanaga K, Nakata N, Kazumi Y, Maeda S, Makino M, Hoshino Y, Kuroda M.</p>	<p>Complete genome sequence and comparative genomic analysis of Mycobacterium massiliense JCM 15300 in the Mycobacterium abscessus group reveal a conserved genomic island MmGI-1 related to putative lipid metabolism.</p>	<p>PLoS One</p>	<p>9(12)</p>	<p>e114848.</p>	<p>2014</p>

学会発表一覧表

発表者氏名	発表タイトル名	学会名	開催年月日	開催地
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	2015 年 2 月 1 日	東京都新宿区
稲崎倫子、名古屋真弓、板持雅恵、嶋一世、小淵正次、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	2014 年 11 月	横浜
福本 瞳、都築慎也、佐藤典子、峰 宗太郎、望月 眞、川名誠司、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆.	日本人からの Trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus のクローニング.	第 113 回 日本皮膚科学会総会.	2014 年 5 月	京都
Katano H, Hishima T, Sakamoto K, Uehara T, Sekizuka T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M.	Profiling microRNA in Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disorders with deep sequencing and real-time RT-PCR.	International Herpesvirus Workshop,	2014 年 7 月	Kobe
高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、長谷川秀樹、片野晴隆.	不明脳炎症例の病理検体における原因ウイルスの網羅的検索.	第 62 回日本ウイルス学会学術総会.	2014 年 11 月	横浜.
福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰宗太郎、保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆.	網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用.	第 62 回日本ウイルス学会学術総会.	2014 年 11 月	横浜.