

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、名古屋真弓、板持雅恵、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：地方衛生研究所では、感染症発生動向調査の中で臨床ないし食品等の検体で病原体診断を行っているが、残念ながら全ての検体の検査が陽性になるわけではない。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。地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用について、今回、薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出、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、変異インフルエンザウイルスは検出できず対照と同様の変異率であった。感染性胃腸炎患者の検体からサポウイルスが検出でき、最初に用いたプライマー配列とは変異があったため原因不明となったことが判明した。また少量の便検体でも十分検討可能であった。これらのことから、その方法や大量のリードの解析への対応が可能となったので、今後さらに検体を解析していくことで地方衛生研究所での次世代シーケンサの利用方法を明かとし、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意義についても検討していきたい。

A. 研究目的

地方衛生研究所では、感染症発生動向調査の中で臨床ないし食品等の検体で病原体診断を行っている。感染症法で1類から5類に定められている100種類以上の感染症のうちのいくつかを対象として病原体検査マニュアルが準備されている。しかし、もし検査対象検体が感染症を原因としていても、残念ながら全ての患者検体の検査が陽性になるわけではない。これには種々の理

由が考えられるものの、一つはその方法論にもあると思われる。次世代シーケンサは、従来のシーケンサと異なり、大量の核酸配列を網羅的に、つまり病原体核酸には非特異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や病原体遺伝子の変異の検出に役立つことが期待できる。そこで地方衛生研究所が感染症発生動向調査において次世代シーケンサの応用を

検討する意味でも、病原微生物が不明であった検体での網羅的解析や耐性ウイルスの検出にどのように使えるかについて、以下の3点について検討した。

1) 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出: 従来のキャピラリーシーケンサによるPCR産物のシーケンスでは、ウイルス試料中のごくわずかな変異ウイルスまでは解析することはできない。そのため、これまではウイルス遺伝子のクローニングを行い、個々のクローンについて塩基配列を解析する必要があった。しかし、次世代シーケンサが開発されたことで、PCR産物のディープシーケンスによりマイナーポピュレーションを検索することが可能になった。そこで、本研究では抗インフルエンザウイルス薬投与中の薬剤耐性ウイルスの発生の有無を調べるため、次世代シーケンサ(MiSeq、Illumina社)を用いて、投薬前後の患者検体から薬剤耐性ウイルスの検出を試みた。

2) 病原微生物不明の感染症を疑う患者検体の解析: 平成23~24年度において、当ウイルス部に無菌性髄膜炎、脳炎・脳症等の臨床診断により搬入された検体の57%、また、感染性胃腸炎の散発事例および集団発生事例として搬入された検体のそれぞれ31%および11%でウイルスが検出されずに原因不明となっている。次世代シーケンサを用いることにより原因不明検体の病原ウイルスが特定できれば、今後の診断、治療、予防等の感染症対策に有用な情報が得られるものと考えられる。しかしながら、次世代シーケンサを用いた病原体検索は、一部の研究機関が研究として開始しているのみで、検査法が確立しているわけではな

い。そこで、上記診断名で当ウイルス部に搬入され、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。

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、検体にはいろいろの制約があって少量しか得られない場合があるため、まず、検討を行った。

B. 研究方法

1) 富山県内の5医療機関において、2012/13年シーズンにインフルエンザで入院加療した小児患者7名から、ペラミビル投与前後(オセルタミビル併用患者1名)に鼻腔ぬぐい液を採取した。検体からRNAを抽出し、アダプタ配列を含むNA遺伝子特異的プライマーを用いて、既知の薬剤耐性変異部位のなかで高頻度に見出されるE119VならびにR292K(N294S)の近傍約100塩基の領域をone step RT-PCR法により増幅した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動により精製してDNAライブラリを調製した。次いで、MiSeq Reagent Kit (300 Cycle)を用いてシーケンスを行い、得られたリードのSNP解析によりE119V、R292KおよびN294Sの変異率を算出した。

2) 無菌性髄膜炎、脳炎・脳症、感染性胃腸炎が疑われ、当ウイルス部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。無菌性髄膜炎、脳炎・脳症例の検体は、2008年から

2012年にそれぞれ8検体、6検体から採取された髄液を用いた。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検査あるいは分離培養検査でウイルスが検出されなかった。感染性胃腸炎は、2013年4月に老人保健施設で発生した集団発生事例から採取された10%便乳剤6検体を用いた。検体からは、遺伝子検査あるいは迅速診断キットでノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスが検出されなかった。各検体からRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, キャリアRNA無添加のBuffer AVLを使用)によりRNAを抽出し、ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation kit (Epicentre)を用いてRNAライブラリを作製した。ライブラリをAMPure XP Purification (Beckman coulter)により精製後、DNA濃度を約11pM/ランに調整し、MiSeq Reagent kit nano 300 Cycles PE (Illumina)を用いて、MiSeqにより塩基配列の解読を行った(paired-end, 120 cycles)。

3) 便検体は、食中毒関連で収集した便検体16検体で、うち、Cary-Blaire培地に埋め込まれた少量便検体(CB便)8検体が含まれる。便のDNA抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いた。抽出したDNAの濃度測定は、NanoDropおよびQubitを用いた。NGS解析用DNAライブラリの作製には、MiSeq用のDNAライブラリ作製キット、NexteraXTライブラリキットを使用した。作製は、製品キットのプロトコール通りに実施した。

(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) ペラミビル投与前後に採取した患者7名の14検体において、E119V、R292KおよびN294Sの各部位で184,121~628,054リードの塩基配列が得られた(図1)。これらのリードをSNP解析したところ、それぞれの部位で0.01~0.14%の変異が検出された。また、N294Sの変異率は他の部位と比べてやや高い傾向がみられた。しかし、投薬前後の検体で変異検出率に大きな違いは認められなかった(図1)。さらに、陰性対照として用いた薬剤感受性ウイルスのNA遺伝子断片を挿入したプラスミドDNAの変異率もウイルス検体とほとんど同じであった。

2) Miseqにより解読された1検体あたりのリード数は、髄膜炎では19,340~55,772(平均33,915)、脳炎・脳症例では16,416~55,280(平均33,071)、感染性胃腸炎は27,626~56,876(平均37,711)であった。MePICを用いたメタゲノム解析により、ヒト以外のゲノムにヒットしたリード数は、1検体あたり髄膜炎では356~21,771(平均5232)、脳炎・脳症例では352~5,962(平均4047)、感染性胃腸炎では1,414~8,343(平均4,772)であり(表1~3)、平均すると総リード数

の約 12%であった。いずれの検体からも、細菌由来の遺伝子配列が最も多く検出された(表 1~3)。特に、脳炎・脳症 1 例(検体番号 5)においてバクテリオイデス属の検出が多かったが(表 2)、発症との関連は不明である。一方、ウイルスの配列に類似した配列が 1 サンプルあたり 11~114 リード検出されたが(表 1~3)、サポウイルス(表 3)以外は、ほとんどはバクテリオファージかあるいはライブラリ作製キットや精製キットの試薬に混入しているウイルス遺伝子の類似配列と考えられた。感染性胃腸炎の 3 検体から 2~6 リードのサポウイルスが検出された(表 3)。いずれのリードも、食中毒事例(2012 年 5 月、名古屋市・万代)から検出されたサポウイルス(Sapovirus Hu/Nagoya/NGY-1/2012/JPN : SaV GV.2)のゲノムの塩基配列の一部と 93~99%一致した。同一事例由来の 3 検体から共通に SaV GV.2 が検出されたことから、本事例は SaV GV.2 が原因であった可能性が考えられた。

3) 便検体から全 DNA の抽出は、QIAamp DNA Stool Mini Kit のプロトコールに準拠して、出発量は 0.5g とした。Cary-Blaire 培地に保存されていた便検体でも Cary-Blaire 培地も含めて 0.5g を使用した。結果を図 2 右表に示した。抽出した DNA 量の測定については、NanoDrop では基本的に OD260 値から DNA 量を換算しているが、Qubit は 2 本鎖 DNA に特異的に親和性の高い蛍光物質を混合して 2 本鎖 DNA を特異的に定量する。実際、定量値は NanoDrop より低かった。また、18 検体中、CB 便検体の 1 検体からは検出されなかつ

た。一方で残りの検体は、0.059~16.75ng/μl であり、通常便検体と CB 便の差はみられなかった。NexteraXT キットによる DNA ライブラリの作製のプロトコールには、0.2ng/μl 濃度の DNA 5μl 必要である。そこで、この濃度の確保できた 14 検体についてライブラリを作成した。最終的に作製した 50μl の反応液の 2.5μl を、1.5%アガロース電気泳動を用いて評価した。結果は図 2 右に示した。合成量が少ない検体(#3,11)はあったものの、他は 500~1,000bp 程度までの DNA が合成されていた。

D. 考察

今回の解析では、ペラミビル投与患者 7 名の鼻腔ぬぐい液検体について、次世代シーケンサを用いて PCR 産物のディープシーケンスを行い、薬剤耐性変異ウイルスの検出を試みた。しかし、投薬前後で変異率に大きな差はみられず、薬剤耐性ウイルスの発生は確認できなかった。ほかの部分における変異については今回、調べていない。さらに、陰性対照でみられた変異率から、検出された変異は PCR 反応に用いた DNA ポリメラーゼのヌクレオチド取込みエラーやシーケンサの検出エラーによるものと考えられた。以上のことから、PCR 産物のディープシーケンスにおける変異検出限界はおおよそ 0.1%であることが示された。今後、MiSeq の変異検出限界について遺伝子変異を有する試料等を用いてさらなる検討を行う予定である。

病原体が不明であった臨床検体から解析したが、検体あたりの総リード数が数万であったため、検出感度を上げるために、総

リード数を一桁以上増やす必要があると考えられた。また、短いリードによるベクター配列（インデックス配列）の混入が非常に多い検体があり、ゲルの切り出し等により 100 塩基長以上の断片を精製すべきと考えられた。今回、感染性胃腸炎の集団発生事例から SaV GV.2 が検出された。リアルタイム PCR による遺伝子検査でサポウイルスが陰性であったのは、既報(J Med Virol 78:1347-1353 (2006)) のプライマーが SaV GV.2 との相同性が低く、反応しなかったためと考えられる。同一事例の複数の検体から共通の配列が検出される場合は、少数のリードでも診断に有用であると考えられた。しかし網羅的解析で候補の病原体が検出されたと考え、最終的には、特異的な PCR や臨床症状を含めた総合的判断が必要と思われる。

次世代シーケンサの解析は、①検体からの DNA あるいは RNA の抽出、②塩基配列決定原理（装置）に応じたサンプル調製、③解析データの処理、の 3 つの工程で実施される。①については、存在する DNA をすべて抽出して解析する DNA-seq と RNA ウイルスや遺伝子転写産物としての RNA を解析する RNA-seq に大別される。②については、最近ではイルミナ社の次世代シーケンサが普及しているとされるが、いずれも装置に応じたサンプル調製が必要である。③については、膨大な配列情報を処理するための技術が必要となりなかなかハードルが高かった。今回、MePIC が利用できるようになり、このハードルが低くなると思われる。本年度は、①に関する要素技術について検討した。その目的は、DNA や RNA を抽出する必要がある臨床検体は、通常は

診断や治療目的で、医療機関で採取されるものであり、仮に不明症例の検体として次世代シーケンサを用いた解析をするにしても、検体の状態に依存することが充分予想される。そこで、今回は、集団食中毒事例で収集された便検体及び少量便検体として Cary-Blair 培地入り便検体から DNA を抽出し、MiSeq で解析可能な DNA ライブラリが作成できるかどうか検討した。その結果、ライブラリは合成されていることが確認された。今後は、このライブラリを MiSeq で解読し、さらに評価したい。今回の便検体は、行政検査のなかで収集されたものであるが、検査目的で既に何回かの凍結融解を繰り返しており、検査する検体として、品質は高くはないと思われるが、一方で、Cary-Blair 便の利用は、本検査の幅を広げ、一患者採取日の異なる検体で比較することにより、原因菌の推定が容易になると期待される。

謝辞：本研究の実施にあたり、検体の採取にご協力いただいた富山市民病院小児科の金田 尚先生、富山赤十字病院小児科の津幡眞一先生、黒部市民病院小児科の篠崎健太郎先生、高岡市民病院小児科の辻 隆男先生、厚生連高岡病院小児科の粕井正春先生に深謝いたします。

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、インフルエンザウイルスの変異の検討が可能であること、感染性胃腸炎患者の検体から既知のプライマー配列とは異なるサポウイルスが検出できたこと、さらに少量の便検体でも十分検

討可能であることが判明した。これらのことから、さらに、次世代シーケンサの利用方法や解析方法の確立とともに、この感染研と地衛研とのネットワークについて検討する。

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

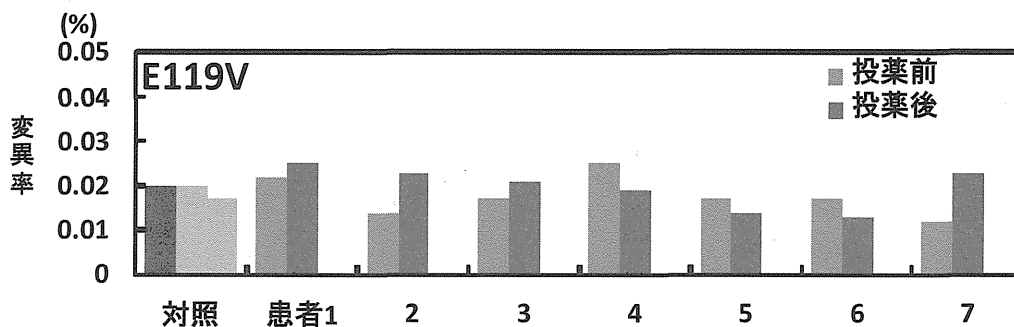
1) Obuchi M, Hatasaki K, Tsubata S, Kaneda H, Shinozaki K, Tsuji T, Kasei M, Konishi M, Inasaki N, Obara-Nagoya M, Horimoto E, Sata T and Takizawa T.

Detection of Resistant Influenza A(H3N2) Virus in Children Treated with Neuraminidase Inhibitors Using a Next-Generation DNA Sequencer. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 米国デンバー、2013年9月

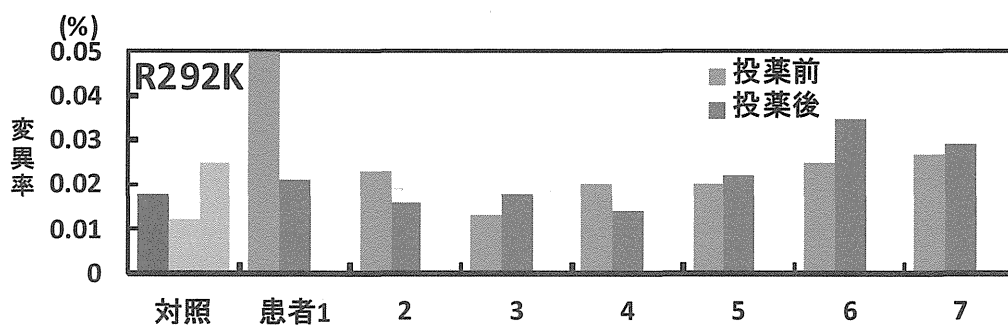
2) 小淵正次、畑崎喜芳、津幡眞一、金田尚、篠崎健太郎、辻 隆男、粕井正春、小西道雄、稲崎倫子、名古屋（小原）真弓、堀元栄詞、佐多徹太郎、滝澤剛則. ノイラミニダーゼ阻害薬投与小児患者における薬剤耐性 A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

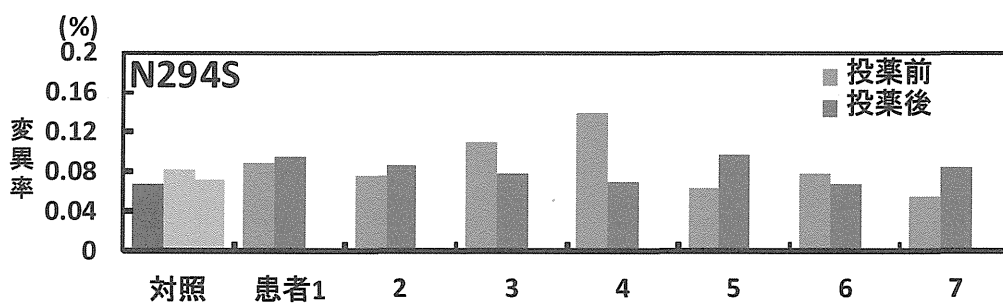
なし



投薬前	変異率	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%
	リード数	283,475	260,926	297,499	280,012	263,018	190,514	281,444
投薬後	変異率	0.03%	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%	0.02%
	リード数	236,330	282,810	218,796	330,959	284,553	291,387	274,049



投薬前	変異率	0.05%	0.02%	0.01%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%
	リード数	520,796	497,307	492,381	516,424	257,427	194,700	231,366
投薬後	変異率	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%	0.02%	0.04%	0.03%
	リード数	628,054	490,324	318,078	252,107	184,121	232,852	213,102



投薬前	変異率	0.09%	0.08%	0.11%	0.14%	0.06%	0.08%	0.06%
	リード数	516,342	492,370	487,514	511,778	271,846	205,543	247,044
投薬後	変異率	0.09%	0.09%	0.08%	0.07%	0.10%	0.07%	0.08%
	リード数	623,094	485,924	315,403	249,488	195,664	247,623	227,085

図1 次世代シーケンサーによるペラミビル耐性A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出

表 1. 無菌性髄膜炎例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス
1	25,792	356	129	0	0	11
2	29,398	3,138	227	0	0	50
3	25,980	4,872	390	3	3	73
4	31,144	946	611	1	1	114
5	44,306	8,572	459	2	2	23
6	55,772	21,771	21,585	1	1	37
7	19,340	1,409	1,297	0	0	16
8	39,590	788	591	0	0	7

表 2. 脳炎・脳症例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス
1	16,416	352	259	0	0	11
2	23,836	3,328	3,170	1	1	84
3	38,010	5,962	5,809	2	2	89
4	30,056	2,371	2,167	1	1	27
5	34,826	6,837	6,746*	0	0	49
6	55,280	5,429	5,289	0	0	76

*Bacteroides 属のリード数 1097 を含む。

表 3. 感染性胃腸炎例の解析結果

検体 番号	総リード数	MEGA BLAST 解 析リード数	微生物由来遺伝子のリード数			
			細菌	原虫、 アメーバ	真菌	ウイルス (サポウイルス)
1	43,708	6,137	2,590	3	4	16 (6)
2	27,626	1,414	948	0	1	12 (0)
3	30,838	7,052	4,806	0	1	3 (0)
4	38,794	8,343	8,205	1	2	15 (4)
5	28,428	2,509	2,252	1	3	76 (2)
6	56,876	3,174	2,801	0	99	10 (0)

#	ID	Shape	NanoDrop ng/ul	Qubit ng/ul	Prep. DNA Library	Priority	Nextera XT PCR
1	KH0505F	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	TM0427H	original	-0.49	1.935	OK	6	OK
6	JH0429F	original	38.51	15.4	OK	4	OK
7	JH0505c	Cary-Blair	-4.9	0.001	not	-	✗
8	SH0429F	original	15.41	4.7	OK	5	?
9	KIM428F	original	57.71	9.95	OK	8	OK
10	YM0000c	Cary-Blair	-0.56	2.53	OK	9	OK
11	KN0000c	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 によるライブラリーの検定

「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連携し、原因食品が特定されていなかった集団食中毒事例を対象に、次世代シーケンサー (NGS) を用いて胃腸炎起因ウイルス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。また、倫理面に配慮し研究を進めるため、検体及び解析データの取り扱い方法について検討した。これらの取組により、国立感染症研究所との間に病原体の NGS による網羅的解析を行うネットワークを構築した。

A. 研究目的

PCR は、感染症や食中毒の病原体検出に広く使用されているが、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に病原体の検索を行う場合には複数の反応を並行して行う必要がある。

一方、最近開発された次世代シーケンサー (NGS) 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、不特定の病原体を対象とした病原体検査への応用が期待されている。

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ため、不明感染症疑

い症例等からの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 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の構築を目的に研究に取り組んだ。

具体的には、倫理面に配慮した検体の収集方法及び解析データの取り扱い方法について検討するとともに、原因ウイルスを含む食品が特定されていなかった集団食中毒事例を対象に感染研病原体ゲノム解析研究センターおよび感染症疫学センターと連携して NGS による胃腸炎起因ウイルス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事例の概要

平成 25 年 1 月某日の昼に、岩手県内の某飲食店で会食した 5 グループ(参加者 94 名)のうち 4 グループの 40 名が、嘔気、嘔吐、腹痛、下痢を主症状とする食中毒様症状を呈した(表 1)。潜伏時間は、9~57 時間で平均は 33 時間 46 分であった。摂食状況調査の結果、発症状況に食品による偏りは認められなかった。また、提供された食事にカキは含まれていなかった。原因調査では、PCR(リアルタイム RT-PCR 及び RT-PCR)により、調査対象としたグループ A の患者及び飲食店の調理従事者から数種類のノロウイルスが検出された。疫学調査の結果、本事例はノロウイルスによる集団食中毒事例と判断された。しかし、カキが提供されていなかったにもかかわらず患者と調理従事者から数種類のノロウイルスが検出されたことや発症状況に食品による偏りが認められなかったことから、疫学的な因果関係を特定できなかった。

2. 材料

グループ A の患者のうちから RT-PCR によりノロウイルスが検出された 8 検体(患者及び調理従事者から採取した糞便または吐物)を対象とした。

3. 遺伝子の網羅的解析

検査材料 0.05g を 1%SDS 加 TE バッファー 500 μ L に懸濁し、フェノール 500 μ L を添加し振とう後、15,000 rpm、5 分の遠心を行い、上清を回収した。得られた上清から High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche)を用いて核酸を抽出し、Qubit® dsDNA HS Assay Kit(Molecular Probes)により抽出した核酸の

濃度を測定した。

核酸抽出液 9.0 μ L から ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre)を用いて cDNA を作成後、FailSafe™ PCR System(Epicentre)を用いて 15 サイクルの Enrichment PCR により DNA の増幅を行った。増幅産物を MinElute PCR Purification Kit(Qiagen)を用いて精製した後、アガロースゲル電気泳動を行い、250 bp~500 bp のバンドを切り出し、アガロース片から Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を用いて DNA を回収した。回収した DNA の濃度を測定して全ての検体が同じ濃度になるよう調整した後、全ての検体を混合しシーケンス用試料とした。100 倍希釈した遺伝子解析用試料 600 μ L を用い、NGS (MiSeq II, Illumina)にて解析した。なお、シーケンス解析は Metagenome モードで行った。配列データの解析は、BaseSpace(Illumina)に格納されたデータを、MePIC 2(感染研サーバー)で加工し、megaBLAST によりレファレンス配列と照合し、配列を決定した。決定した配列は次の解析用ソフトを用いてさらに検討した。系統樹作成等の解析には MEGAN (Universität Tübingen)を、ショートリードのマッピング・アセンブリには CLC Genomics Workbench(CLC bio)を、アセンブリ結果の評価には Tablet(The James Hutton Institute)を用いた。

(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。①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。②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。③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た。

C. 研究結果

現在、シーケンスデータを解析中であるが、表2に RT-PCR によるウイルス検出状況と NGS によるウイルス検出状況を示した。

対象とした検体は、RT-PCR で、全ての検体からノロウイルスが、1 検体からアイチウイルスが検出された検体である。

NGS による網羅的解析により、全ての検体からノロウイルスとアイチウイルスのリードが検出された。しかし、得られたリード数が少なく、遺伝子型の決定や株間の塩基配列の比較に必要な量の配列データを決定できない検体も多かった。十分な量の配列データが得られたのはノロウイルスが 5 検体、アイチウイルスが 1 検体であった。

D. 考察

因果関係が不明であったノロウイルスを原因とする集団食中毒事例を対象に、因果関係の解明につながる新たな情報を得ることを目的に、NGS による網羅的解析を行った。

その結果、ノロウイルスとアイチウイルスのリードが全検体から得られた。しかし、得られたリード数が少なく疫学的解析に十分な量の配列データが得られない検体が多

く、これまでのところ、因果関係の解明につながるデータは得られていない。

十分な量の配列データを得るためには対象とするウイルスのリード数を増やすことが必要であるが、本村らは、糞便からのノロウイルスの網羅的な解析に特異的なプライマーを用いた PCR 産物を網羅的解析の出発材料としている。

今後は、NGS により得られる検出対象ウイルスのリードを増やせるよう、出発材料の種類や前処理法について検討することが必要と考えられた。また、NGS により得られたデータ解析を円滑に行うため、さらなる解析技術の習得・熟練が必要と考えられた。

E. 結論

国立感染症研究所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することを目的に、倫理面に配慮した検体の取扱い方法及び解析データの取扱い方法について検討するとともに、感染研と連携して NGS による網羅的解析を実施した。今後はさらなる高度な解析技術習得を行うとともに、検出対象について疫学解析上、十分な量の配列情報が得られるよう網羅的解析の出発材料の種類や検体の前処理方法について検討する予定である。

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

表1 患者発生状況

グループ名	摂食者数	患者数	食事のメニュー
A	51	26	わんこそば、弁当
B	31	12	皿盛
C	2	1	わんこそば
D	4	0	わんこそば
E	6	1	わんこそば
合計	94	40	

表2 ウイルス検査状況

番号	検体	被験者	RT-PCR		網羅的解析（リード数）	
			Norovirus	Aichivirus	Norovirus	Aichivirus
1	糞便	患者	● (GII-4)		1,341 (GII-4)	17
5	糞便	患者	● (GII-2)		12 (GII-2)	4
6	糞便	患者	● (GII-11)		40	1
7	糞便	患者	● (GII-4)		4	1
8	糞便	患者	● (GII-4)		397 (GII-4)	5
9	嘔吐物	患者	● (GII-4)		30	9
10	糞便	調理従事者	● (GII-4)		114 (GII-4)	1
11	糞便	調理従事者	● (GI-4, GII-4)	● (type 1)	2,880	10,046 (type 1)

●：検出 ()：型

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

感染症診療において起因病原体の特定は、適切な治療を行う上で極めて重要である。しかし、培養や特定病原体の遺伝子を検出するこれまでの微生物検査法では起因微生物の特定が困難なことが少なくない。東邦大学医療センター大森病院で、臨床像から感染性心内膜炎が強く示唆されるにもかかわらず、血液培養で細菌が培養されず、その特定に至らなかった症例を経験した。当該患者は、弁置換術が施行されたことから、採取された疣贅および弁組織検体を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析および16s rRNAをコードする遺伝子解析による病原体の検出・同定を試みた。網羅的病原体ゲノム検索の結果、リード数から優勢と思われる主要な菌種は *Streptococcus pneumoniae* と *Abiotrophia defectiva* であった。並行して実施した16S rRNA解析でも全ての検体から *A. defectiva* の16S rRNAと相溶性の高いDNA塩基配列が確認された。これまでの検査で原因菌が不明とされていた感染性心内膜炎症例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNAの塩基配列を解析することにより、原因菌が *A. defectiva* であることを特定するに至った。今回の結果から、通常検査では起因微生物が特定できない場合でも、網羅的病原体ゲノム解析により病原体を特定できる可能性があることが示唆された。

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。

2014年2月に、東邦大学医療センター大森病院で臨床像から感染性心内膜炎(IE)が強く疑われるにもかかわらず、起因病原体の特定に至らない患者に対して弁置換術が施行された。その際切除された組織(疣贅、および無冠尖、右冠尖、左冠尖)を対象に、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を行なった。

B. 研究方法

臨床像から感染性心内膜炎が疑われるが起病原因の特定に至らなかった患者の弁置換術で切除された組織（疣贅：S25、および無冠尖：S26、右冠尖：S27、左冠尖：S28）より、核酸を抽出し、Nextera XT DNA Sample Prep kit (illumina) を用いて DNA ライブラリを作成した。DNA ライブラリのシーケンスは次世代シーケンサー (MiSeq, illumina) で行った。解析では、得られたデータのなかでクオリティの低いリードや塩基を除去し、さらにヒトゲノムに由来する配列を削除した。次に、残った配列を megablast で公知の病原体配列データベースと照合した。megablast で得られた結果を MEGAN (チュービンゲン大学) で閲覧した。検出された病原体分類上の属や種、そしてその配列数から IE の原因微生物を推測した。

16S rRNA をコードする遺伝子領域を PCR 法で増幅し、直接得られた増幅産物の塩基配列を決定することからも、併せて検体組織中に存在する病原体の特定を試みた。

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

各リードの megablast でトップヒットした細菌グループを集計した。検体 S25 では、ヒト配列を除去後のリード数 (136,683 本) のうち、Bacteria にヒットしたリードの割合が 4.87% (6652) であった。データベースに存在する配列にヒットしない配列は 84.8% (115,952 本) であった。Bacteria のリードのうち、Firmicutes にヒットした配列の割合が 94.0% (6250 本) であり (図 1)、そのうちリード数の割合として優勢な菌種は *Streptococcus pneumoniae* 16.2% (1001 本)、*Abiotrophia defectiva* 11.5% (710 本) の 2 つであった (図 2)。他の 3 検体でも同様の結果であった。

また、並行して実施した 16S rRNA をコードする DNA 塩基配列の解析からも全ての検体から *A. defectiva* の 16S rRNA と最も相同性の高い塩基配列が見出された。

図1. Bacteriaにおけるリードの内訳

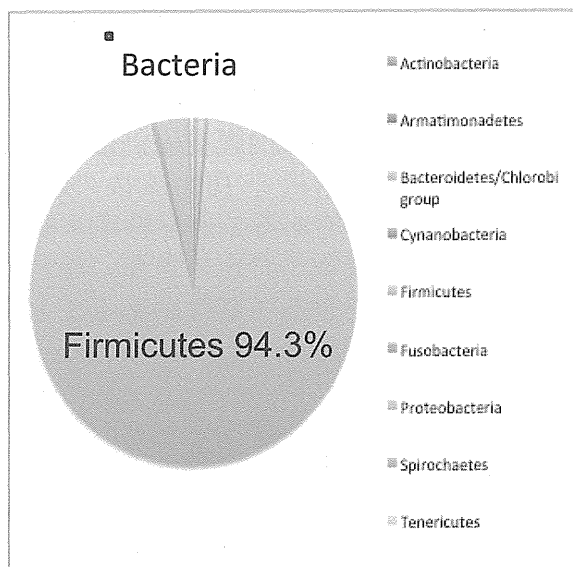
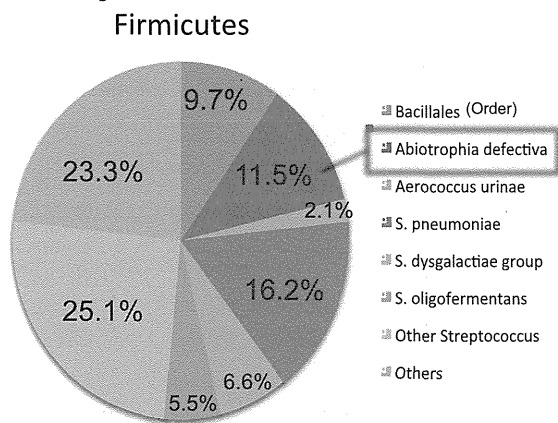


図2. Firmicutesにおけるリードの内訳



D. 考察

一般に、IEの起因病原体は血液培養から、もしくは疣贅等の感染部位の培養から検出される。しかし、本症例では血液培養から細菌が培養されなかった。さらに、培養法では弁置換術の際に切除された組織（S25～28）からも細菌は培養されなかった。

本研究では、次世代シーケンサーにより得られたデータを解析することにより、細菌のなかでも *S. pneumoniae* および *A. defectiva* のリードが優勢であった。IEの原因菌として *S. pneumoniae* は考えにくく、過去に *A. defectiva* によるIEや血流感染の報告が見られたため、本菌種が原因菌として有力であると考えられた。

また、16S rRNAをコードするDNA塩基配列を解析したところ、いずれの検体から *A. defectiva* の16S rRNAと最も相同性の高い配列が確認された。この2つの解析結果を総合して、今回のIE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えた。

次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析は、起因微生物が予測できない場合や、本症例のように培養陰性である場合にその力を発揮する。また、本手法は定量性もあるため、患者もしくは対象検査材料内における微生物量を判断できる。

本研究では、原因微生物が培養不可であった感染症の、次世代シーケンサーを用いた病原体ゲノムの網羅的解析が、病原微生物

物の同定と臨床診断の一助となることを示した。

E. 結論

原因菌が不明であったIE症例の疣贅および弁検体を用いて次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNA解析を実施した。その結果、本IE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えられた。

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

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

研究協力者 福本 瞳、佐藤由子、高橋健太、保科しほ、中島典子、長谷川秀樹（国立感染症研究所・感染病理部）、都築慎也、佐藤典子、望月眞、峰宗太郎、松下竹次（国立国際医療研究センター）、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（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）

研究要旨

原因不明であった感染症症例の病理検体を対象に、網羅的ウイルス遺伝子検出法を用いて、既知の病原体遺伝子を検出すること、および、次世代シーケンサーを用いて、未知の病原体遺伝子を検出することを目的とした。2013年に国立感染症研究所感染病理部にコンサルトされた23例の不明疾患症例につき、163種類のウイルスを同時に網羅的に検出可能な **multivirus real-time PCR** を用い、原因ウイルスの同定を試みた。その結果、8例（35%）で原因ウイルスが同定され、**multivirus real-time PCR** が次世代シーケンサーを行う前のスクリーニングに有効であることが示唆された。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での解析を行ったが、有意なウイルスは検出されなかった。一方、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された **trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)** の解析を行った。当該患者の心筋組織から TSV の全長遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定し、世界で3番目の株として GenBank に登録した。

A. 研究目的

次世代シーケンサーは感染症検体における微生物遺伝子を検出する、極めて有力なツールであり、データベースに登録されている既知の病原体遺伝子配列の他に、未知の病原体の遺伝子配列も解読することが可能で、しかも、その感度はPCRとほぼ同等である。近年、発見された新しいウイルスの多くは次世代シーケンサーを用いて発見されている (**Merkel cell polyomavirus, human polyomavirus 6** と **7**)。しかし、次世代シーケンサーの解析には高額なランニングコストがかかる上、一度のランで極めて多くの遺伝子情報が得られることから、その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を要し、長い時間がかかる。このため、現在ではすべての検体につき、次世代シーケンサーの解析を行うことは現実的でない。次世代シーケンサ

ーの解析にふさわしい症例、サンプルであるかどうかは、多くの臨床情報を集め、患者の状態、症状、緊急性、サンプルの種類、状態、量等から総合的に判断する必要がある。特に、十分な微生物学的検索がなされているかが、重要な点であるが、では、どのような検索が事前になされていればよいか、は基準がない。

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不明感染症例や、これまで感染症が疑われながらも、原因が明らかでない疾患の病理検体が毎年、数十検体、コンサルテーションとして送られてきている（感染病理部リファレンス症例）。われわれはこれらの症例につき、組織形態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き

た。また、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Real time 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、依然として原因不明のままである症例が多い。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を対象に、次世代シーケンサーで全遺伝子を解読することで、未知、あるいは、既知の病原体遺伝子の検出を試みた。

また、われわれは2012年に0歳児の心筋炎サンプルから、trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus (TSV)の核酸断片を、次世代シーケンサーにより検出した。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番目のヒトポリオーマウイルスという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。今年度は、本症例から、TSVの全長遺伝子をクローニングし、全遺伝子配列を決定した。

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。

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

ヒトに病原性を持つと考えられる163種類のウイルスを96穴プレート上で一度に検出できるreal-time (RT-)PCRシステムを本研究室で独自に開発し、これにより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 (研究協力者 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 遺伝子の増幅と全長遺伝子のクローニング

心筋凍結組織から抽出したDNAを鋳型に Toyobo KOD-FX を用い、long PCR を行った。増幅された TSV の全長遺伝子は pCR-Blunt にクローニングした。塩基配列の決定は Dye Terminator 法により、通常の DNA シーケンサーを用いて行った。TSV を特異的に検出する real-time PCR では、TSV の VP1 領域である nt 1,841-1,923 (GenBank GU989205)を標的とする Taqman PCR を行った。

(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)。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。

C. 研究結果

1) 感染病理部リ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

2013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23例であり、このうちの8例(35%)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)。検出されたウイルスの内訳は単純ヘルペスウイルス2型、水痘帯状疱疹ウイルス、コクサッキーウイルスA6型、コクサッキーウイルスB3型(2例)、日本脳炎ウイルスであった。multivirus real-time PCRでは、TTVやヒト内因性レトロウイルスの遺伝子が検出される例が少なくないが、これらのウイルス遺伝子はヒトの健常者や健常部位からも検出されるものであり、有意ではない。上記、ウイルスの多くは病理組織(生検、剖検)において、免疫組織学的に確認されたもので、病理学的に原因と考えられるウイルスである。

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 例については病理検体から抽出した RNA について、次世代シーケンサーの解析を行った (表 2)。検索の結果、有意なウイルスを検出することができなかった。表 2 に示す第 2 例では Avian leukosis virus の遺伝子断片が検出されているが、これは、逆転写酵素に含まれるものであり、非特異的なものであることが判明している。また、3 例目は EBV が関連することがすでに分かっており、EBV 以外のウイルスの関与を期待したが、有意なウイルスは検出されなかった。

2) 心筋炎から検出された TSV の検討

2012 年に感染病理部にリファレンス症例として解析依頼のあった、0 歳児の心筋炎症例から次世代シーケンサーの解析により TSV の遺伝子断片が検出された。今年度はこの心筋の凍結検体から TSV の遺伝子を増幅し、その全長遺伝子の配列決定を行った。心筋から抽出した DNA からは long PCR により 5.2 kpb におよぶ TSV の全長遺伝子の増幅が可能であった (図 1)。PCR 産物を pCR-Blunt ベクターにクローニングし、TSV 遺伝子の全長遺伝子配列を決定した。シーケンスした遺伝子配列は既報告の 2 つの TSV と 99% の相同性があり、他のヒトポリオマウイルスとの相同性は、HPyV9 と 52%、その他は 50% 以下であり、本遺伝子配列が TSV であることが確認された。TSV-TMC 株 (Tokyo MyoCarditis が由来) と命名し、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。

本症例は剖検例であり、脳を除くほぼすべての臓器が採取されていることから、臓器別の TSV 量を、TSV 遺伝子の特異的に検出する real-time PCR により測定した。その結果、心臓に TSV が濃縮されていることが明らかになった (図 3)。さらに、TSV-TMC 株から、VP1 の遺伝子を増幅し、現在、VP1 に対するモノクローナル抗体を作製している (研究協力者 梁らによる)。

D. 考 察

不明感染症例の一般的な定義は存在せず、病院や医療機関の多くの医師は、不明感染症例とされる症例を日常的に経験している。その中には、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、原因が不明で、

不明感染症例とされている症例もあるであろう。地方衛生研究所等から微生物検索依頼がなされた症例は、原則として疑わしい微生物に対する検索が終了しているものである。次世代シーケンサーの解析は、サンプルに含まれるすべての遺伝子情報を解読するものであり、病因微生物の遺伝子が含まれる場合には、かなり高い確率で検出可能である。しかし、不明感染症例のすべての症例を解析することは予算的にも、時間的にも不可能である。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が、目安となる検査やスクリーニング法が存在すれば、効率的な検査が可能かも知れない。本研究でわれわれが用いた multivirus real-time PCR は次世代シーケンサーよりも手軽に、低予算で、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極めて有用なスクリーニング法と考えられる。

われわれが病理の検体を検索対象としている理由は 2 つある。一つは病理検体はすでに組織学的診断が付いているものがほとんどであり、明らかな感染症以外の疾患を除外することができる点である。組織学的検索により病変部が確実に含まれているかどうか分かる点は、不明感染症の検索には極めて有利である。もう一つの理由は、multivirus real-time PCR や次世代シーケンサーで検出された微生物が、果たして病因微生物であるかどうかを、病理検体に戻って、病理組織学的に検索が可能である点である。血液などの体液サンプルでは、病変部位を反映した結果が得られず、最終的な結論が出ないことが多いのに対し、病理検体は病変部を直接、組織学的に免疫組織化学や in situ hybridization などで検索することにより、検出微生物が病変部と関連があったかどうか、結論が得られる確率が高い。病原体遺伝子を検出する網羅的微生物検出法を利用した際には、PCR も次世代シーケンサーも、極めて感度の高い方法であるために、有意でない微生物遺伝子がしばしば検出される。病理検体以外のサンプルではこの判定がむずかしく、今後、多くのサンプルを検討することにより、検出された微生物が病因微生物であるかどうかを判定する方法、適切なサンプルを選択する方法が次第に明らかになっていくことが期待される。

TSV はこれまでのところ、顔面皮膚の高角化症である trichodysplasia-spinulosa 以外には疾患との関連は明らかにされていない。今回の心筋炎の症例で

は心臓に TSV が濃縮されていること、心臓から TSV の全長遺伝子が検出されていること、また、Ori を挟んだプライマーで PCR を行ったところ、増幅が可能であったこと（データは示していない）から、心臓には環状の TSV が存在していたことが示され、これは心臓で、TSV の複製が起きていた可能性を示唆している。これまで、TSV の報告例はほとんどが皮膚に限定されており、心臓から検出されたとする報告はない。心筋炎の原因ウイルスはエンテロウイルスやヘルペスウイルスなどが知られるが、感染病理部のリファレンス例でも、多くの心筋炎の症例が原因微生物不明であり、TSV は新たな心筋炎の原因ウイルスであるかも知れない。今後、作成中の抗体を用いた組織学的検索の結果が待たれるところである。

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、検索した症例の 35% 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。また、3 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、有意なウイルスは検出されなかった。心筋炎症例から TSV の全長遺

伝子のクローニングし、全塩基配列を決定した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1) 論文発表 なし

2) 学会発表

- (1) 片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 ワークショップ 「感染病理学の新展開」第 102 回 日本病理学会総会. 札幌。2013.4.
- (2) 中島典子、片野晴隆 定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法と病理検体への応用 シンポジウム 3 病原体の新しい診断法 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会 宮崎 2013 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） 該当なし

表1 2013年にMultivirus real-time PCRで検索した病理検体の結果。HSV: herpes simplex virus, VZV: varicella zoster virus, Cox: coxsackievirus, JEV: Japanese encephalitis 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	4	HSV-2, VZV, CoxA6, JEV
心筋炎	7	3	CoxA2, B3
リンパ節腫脹	2	0	—
血液貪食症候群	2	0	—
その他	3	1	VZV
合計	23	8	—

表2 2013年に次世代シーケンサーの解析を行った病理検体。SFTSV: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, EBV: Epstein-Barr virus.

No.	疾患名	年齢、性別	組織	結果
1	急性心筋炎	10歳代 女性	剖検組織	有意な微生物遺伝子は検出されない。
2	亜急性壊死性リンパ節炎	50歳代 男性	ダニに咬傷後の所属リンパ節腫大。SFTSV陰性。	有意な微生物遺伝子は検出されない。 (Avian leukosis virus →逆転写酵素由来)
3	形質芽細胞リンパ腫	60歳代 男性	EBV陽性。	EBVのみ。

表3 TSV-TMC株と既報告のTSVおよび他のヒトポリオマーウイルスとの相同性。TSV: trichodysplasia-spinulosa associated polyomavirus, HPyV: human polyomavirus.

Virus gene (GenBank Accession No.)	Homology (%)
TSV (JQ723730)	99.4
TSV (GU989205)	99.4
HPyV9 (NC_015150)	52.0
KI polyomavirus (NC_009238)	49.88
JC virus (PLYCG)	49.53
BK virus (PLYCGAS)	49.39
Merkel cell polyomavirus (NC_010277)	49.34
HPyV7 (NC_014407)	47.70
HPyV6 (NC_014406)	47.55

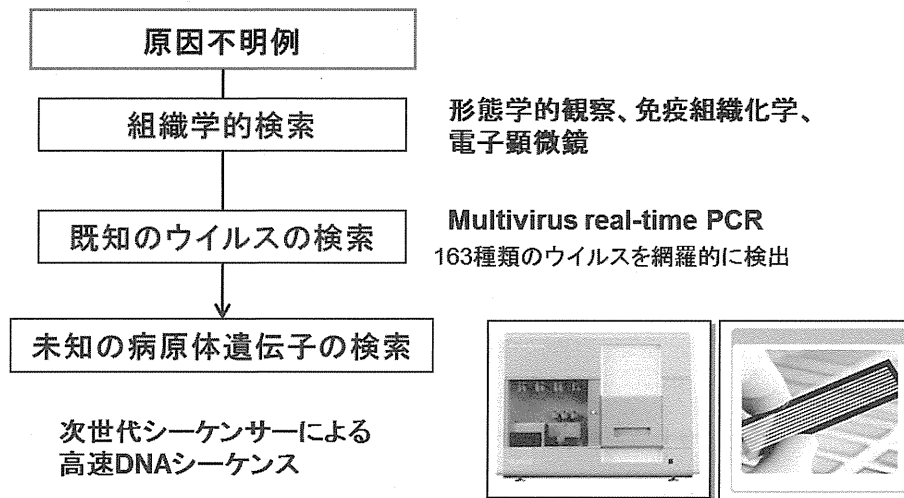


図1 本研究における原因不明症例の病原微生物の検出の概要

原因不明症例の病理検体は、まず、HE染色などの組織学的検索がなされ、明らかな感染症以外の疾患は除外される。また、検体に病変部が含まれるかどうか、組織学的に検索される。組織学的に感染症が疑われる検体では、考えられる微生物を検出する免疫染色や特殊染色を行なう。必要により、電子顕微鏡でウイルス粒子などを観察する。組織学的にウイルス感染が疑われるものの、病理組織学的な検索で原因ウイルスを同定できないサンプルは、multivirus real-time PCRによりウイルスの網羅的検索を行う。Multivirus real time PCRは、multiplex Taqman real time PCRを応用した網羅的ウイルス検出キットで、感染病理部で独自に開発したものである(Katano et al. J Med Virol 2011 83:322-330)。各ウイルスの probe-primer セットを 96 穴プレートに配し、Fam と Hex の二つの蛍光標識プローブを使用することで、ひとつの well で 2 種類のウイルスを検出できるよう設計されている。また、同一プレート上で定量線を作成し、各ウイルス量がだまかに計測可能である。各 probe-primer セットは約 100bp のウイルス核酸断片を検出できるよう設計されており、パラフィン切片から抽出した核酸など、断片化した核酸にも対応可能である。Multivirus real-time PCR でも、原因ウイルスの同定に至らない検体が次世代シーケンサーの解析対象となる。

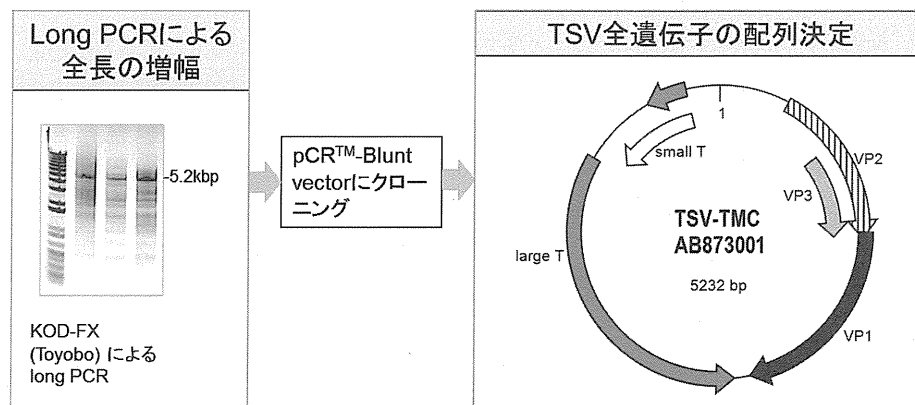


図2 TSVの全長遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

心筋組織から抽出した DNA より long PCR により、TSV 遺伝子の全長 (5.2 kbp) の増幅が可能であった (左図)。PCR 産物を pCR-Blunt vector にクローニングし、TSV 遺伝子の全長の塩基配列を決定した。塩基配列は TSV-TMC 株として、GenBank に登録されている (accession no. AB873001)。右図には TSV-TMC 株の遺伝子構造を示す。既報告の TSV と遺伝子構造は変わらない。

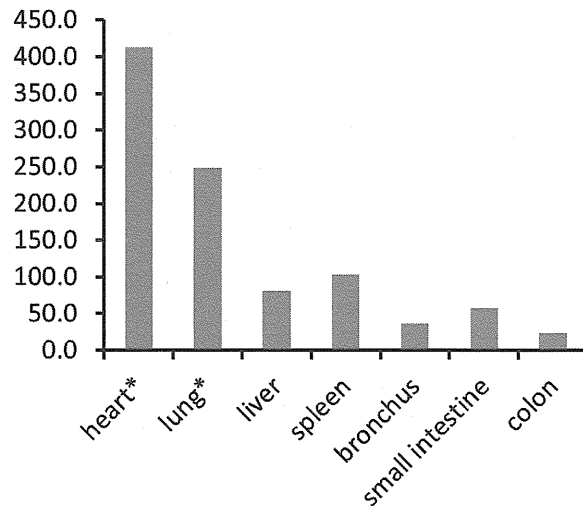


図3 TSV が検出された心筋炎患者の各臓器における TSV 量の定量。

TSV の VP1 を特異的に検出する real-time PCR により、各臓器から抽出した DNA を検索した。縦軸は DNA 100ng あたりの TSV コピー数を示す。心臓が最も TSV 量の高い臓器であり、心筋炎との関連が示唆される。心臓*と肺*以外はパラフィン切片による検索である。