

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
 研究期間：2018～2019  
 課題番号：17KK0170  
 研究課題名（和文）ハイスループットシーケンスによる網羅的ウイルス検出法の確立とその臨床応用  
 研究課題名（英文）Metagenomic virus detection in clinical specimens using high-throughput sequencers  
 研究代表者  
 黒崎 陽平（KUROSAKI, Yohei）  
 長崎大学・感染症共同研究拠点・准教授  
 研究者番号：40415443  
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円  
 渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：次世代およびナノポアシーケンスを含めたハイスループットシーケンス技術を用いた臨床試料からのウイルスメタゲノム解析法を確立し、新たなウイルス感染症のサーベイランス手法として応用を試みた。西アフリカにおけるエボラウイルス病の流行において、エボラ擬似症例とされた試料について、全ゲノム増幅法を利用したメタゲノム解析を行ったところ、麻疹ウイルス遺伝子を検出し、その全長配列を決定した。また、タニ媒介性の出血熱を起こすクリミア-コンゴ出血熱ウイルスについて、ナノポアシーケンスによる簡易かつ迅速なウイルスゲノム配列決定法を開発し、ウイルス流行地域より採取されたマダニ試料からウイルス配列を決定した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

新たなウイルス感染症のアウトブレイクにおいて、原因ウイルスをいち早く同定し、そのゲノム配列情報からウイルス学的性状を把握し、感染源を推定することは極めて重要である。ウイルス流行時において、個々の分離株のゲノム配列情報は、疫学情報から推定されるウイルス拡散経路を裏付け、より詳細な伝播モデルの推定を可能にする。今回開発したハイスループットシーケンスによる網羅的なウイルス検出法、並びにナノポアシーケンスを用いたウイルスの迅速ゲノム配列決定法は、現在まさに流行している新型コロナウイルスのような新たなウイルス感染症の発生時にも活用できる技術であり、感染症対策に資することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：For a comprehensive detection of the viruses in clinical samples and virus surveillance in virus outbreak settings, we established a method of viral metagenomic analysis using high-throughput sequencing technologies including next-generation sequencer (NGS) and nanopore sequencer MinION. Using whole genome amplification and Illumina NGS, we determined a genome sequence of Measles virus in the Ebola-negative samples collected in the endemic of Ebola virus diseases in West Africa. We developed a rapid viral genome sequencing for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) using target genome amplification by tiling PCR, and nanopore sequencer MinION. We retrospectively determined the CCHFV sequences in the ticks and human blood samples collected in the virus endemic area in Tajikistan. Our methods can be used for rapid viral genome sequencing and surveillance of the virus circulating in settings of virus outbreaks.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 出血熱 次世代シーケンス ナノポアシーケンス メタゲノム 診断 分子疫学

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 西アフリカでは2014年から2016年にかけて、過去最大のエボラウイルス（EBOV）の流行が発生した。ウイルス感染症のアウトブレイクに迅速に対応するには、現地で実施できるウイルス同定法の整備と平時からこの地域における感染症発生状況を監視することが重要である。しかしながら、西アフリカは元々医療体制が脆弱な地域であり、感染症の発生状況については限られた情報しか把握されていない。将来起こり得るEBOVのアウトブレイクに迅速に対応するには、この地域の背景として、どのような感染症が発生しているかを把握し、継続的に監視することが重要である。

(2) 近年発展が目覚ましいナノポアシーケンサー MinION(オックスフォード・ナノポアテクノロジー社)は、従来の次世代シーケンサー(NGS)に匹敵する塩基配列情報を出力しながらUSBメモリ大の小型装置で実施でき、フィールドやラボ設備が十分でない途上国での使用に適している。メタゲノム解析はサンプル中に存在する全ゲノム配列を網羅的に解読する手法であり、未知のウイルスも含めた網羅的なウイルス検出法にも利用される。ナノポアシーケンサーによるウイルスメタゲノム解析法は、途上国における感染症アウトブレイク時の迅速な原因ウイルス同定法として活用できる。

(3) これまでにギニア国立ドンカ病院と共同で、EBOV流行時のエボラ疑似症例(PCR検査陰性例)の原因となりうる病原体を明らかにするため、血中のRNAウイルス等をウイルス特異的RT-PCRにて検出した。その結果、マラリア、麻疹ウイルス、コクサッキーウイルスなどを検出した。これらの病原体による感染症がギニアにおいて蔓延していること、またエボラウイルス病流行時においては、これらの感染例がエボラ疑似例として扱われていたことを明らかにした。しかしながら、PCR法によるスクリーニング検出法では検出対象に限界があり、より詳細なウイルス感染状況を把握するためにはNGS等による網羅的なウイルス検出法が有用だと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、NGSおよびナノポアシーケンス等のハイスループットシーケンス技術を用いた臨床試料のウイルスメタゲノム解析法を確立すること、更にEBOV流行地域における新たなウイルス感染症サーベイランス手法としての有用性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、イギリス公衆衛生庁(Public Health England, PHE)ロジャー・ヒューソン博士との共同研究として実施した。

#### (1) ハイスループットシーケンスによるウイルスメタゲノム解析法の確立

臨床試料から抽出したRNAサンプルを出発材料と想定し、ランダムプライマーによるcDNA合成およびSequence-independent single primer amplification(SISPA)法にて全ゲノム増幅後、各シーケンスプラットフォームに合わせた試薬を用いてDNAライブラリーを調製した。NGS(Illumina社MiSeq等)あるいはナノポアシーケンサーMinIONにてメタゲノム解析を行い、決定されたウイルスゲノム配列をリファレンス配列と比較することにより、各解析法のシーケンス精度を調べた。

#### (2) 不明発熱症例におけるウイルスメタゲノム解析

エボラウイルス病疑似症例の血液試料から抽出されたRNAサンプルを用い、NGSによるウイルスメタゲノム解析を行った。新たに同定されたウイルスゲノム配列及び公開されるデータベース上の塩基配列を用いて、分子系統解析を行った。

#### (3) ナノポアシーケンサーによる迅速ウイルスゲノム同定法の開発

ダニ媒介性出血熱であるクリミア-コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)について、各分節の全塩基配列を増幅するため、隣接する増幅断片が互いにオーバーラップする8つのPCR増幅用プライマーペアを設計し、1ランでCCHFVの全ゲノム増幅するtiling PCR法を開発した。精製した増幅産物よりDNAライブラリーを調製し、MinIONにてシーケンスを行った。バイオインフォマティクスツールを用いてゲノム配列決定用パイプラインを作成し、MinIONの出力リード(fastqファイル)からウイルスゲノム配列を決定した。最終的に決定された配列とリファレンス配列との比較から、シーケンス精度を検証した。

#### (4) ナイロウイルス遺伝子検出法

ナイロウイルスの L 遺伝子の保存領域に対し、semi-nested プライマーを設計した。CCHFV を含む 9 種 (7 遺伝子型) のウイルス RNA、および 7 ウイルス種 (7 遺伝子型) 由来のプライマー増幅領域を含む合成 RNA を用いて、semi-nested RT-CPR によるナイロウイルス検出法の検出特異性、検出感度を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ウイルスメタゲノム解析による網羅的ウイルス検出法

先行研究にて、麻疹ウイルス陽性であった発熱症例 (エボラウイルス病擬似症例) の血液サンプルから抽出された RNA サンプルについて、ランダムプライマーを用いた SISPA 法による全ゲノム増幅、およびイルミナ MiSeq によるシーケンスを行った (図 1)。パイオインフォマティクスツールを用いて出力リードから麻疹ウイルスと相同性の高い contig を検出し、リファレンス配列を用いたマッピングでは、90% 以上のゲノムカバレッジを得た。ブランク領域の塩基配列はダイレクトシーケンス法にて決定し、最終的に麻疹ウイルスのギニア分離株 (MeV/GIN/TEL34/2014) として初めて全長配列を決定した。分子系統解析から、新たに同定したウイルス株はギニアで以前分離されたウイルス株、および隣国のセネガルやリベリア等を含む西アフリカ分離株が属する遺伝子型 B3.1 に帰属することがわかった。ギニアでは近隣国も含めた麻疹の持続的な流行が起きている可能性が推察され、同国でも麻疹の継続的なサーベイランスが重要であると考えられる。また、今回エボラ擬似症例から麻疹ウイルスが分離されたことから、エボラウイルス流行下においても麻疹の流行が起っていた可能性も示唆された。エボラ流行時には、マラリアが最も重要な鑑別疾患とされるが、細菌性疾患と並び、麻疹も鑑別疾患として注視が必要だと考えられる。

今回確立したメタゲノム解析により、不明熱例の臨床検体から原因ウイルスを特定することができた。今後は解析実数を増やし、その有用性について更なる検証を行う必要がある。

##### (2) ナノポアシーケンサーによるウイルスシーケンス法の開発

CCHFV はアフリカ、ヨーロッパ、アジアにかけ広い流行域を示し、分離株は地域によって多様な塩基配列を持つことが知られる。はじめに、3 分節からなる CCHFV のゲノム配列を増幅する方法として、8 つのプライマーペアによる tiling PCR 法を新たに開発し、その増幅産物 (1.7-4.4kbp) を MinION にてシーケンスする CCHFV のウイルス塩基配列決定法を開発した。アフリカ、アジアおよびヨーロッパにて分離された異なる lineage に属するウイルス株計 7 株についてシーケンスを行った。各ウイルス株から得られたリードをリファレンス株にマッピングしたところ、各分節のゲノムカバレッジは S 分節 (1.7kb) が 100%、M 分節 (5.6kb) が 100%、L 分節 (12.1kb) が 99.5-100% であった (図 2)。またサンプル中のウイルス RNA が低コピー数の場合であっても (Ct 値 30 以上) ほぼ全長カバーするシーケンスデータを得た。また、パイオインフォマティクス手法により MinION リード (fastq ファイル) から CCHFV のゲノム配列を決定するパイプラインを新たに構築した。既に Genbank 上にゲノム配列が公開されるウイルス株 (5 株) について、本法のシーケンス精度を調べたところ、S 分節が 93-99%、M 分節が 95-100%、L 分節が 94-100% であった。

CCHFV ゲノムサーベイランス法としての有用性を検討するため、2015 年にタジキスタンにて採取された CCHFV 陽性マダニ及びヒト血液試料より、ウイルスゲノムシーケンスを試みた。今回 5 検体 (Ct 値 21-32) について上述の方法でシーケンスを行い、各分節のゲノムカバレッジ

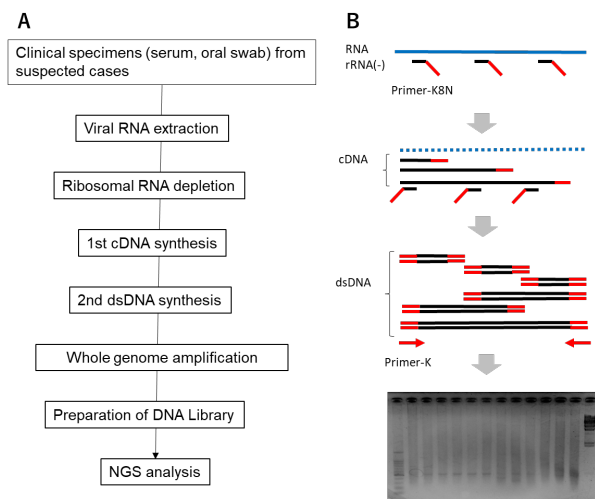


図 1. ウイルスメタゲノムシーケンス法。

A. 実験の流れ図 B. SISPA 法による全ゲノム増幅

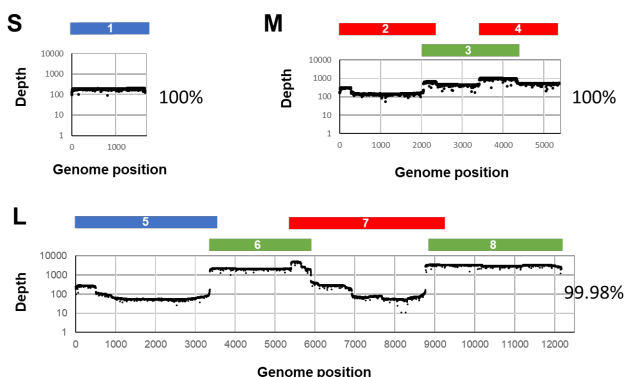


図 2. MinION による CCHFV シーケンス結果。各分節のゲノムポジションに対しマッピングされたリードの深度 (depth) をプロットした。Tiling PCR による増幅断片を各プロットの上部に記す。

ジは 93-100%であった。今回の方法により実際の試料から CCHFV の全長配列を決定できることが分かった。解析したマダニおよびヒト分離株は高い配列相同性を示した。系統解析を行ったところ、いずれの株も S,M 分節は中央アジア株を主とする Asia-1 lineage に、L 分節は中東及び中国株が主に属する Asia-2 lineage に属した。このことから、今回解析したタジキスタンの地域では、中央アジアおよび中東に由来するウイルスのリアソータント株が蔓延している可能性が示唆された。

PHE 及びバーミンガム大学 (Nick Roman 博士) とともに、バーミンガム大学が以前開発したザイル・エボラウイルスのナノポアシーケンシング法 (Quick et al., Nature Methods, 2015) の改良版の検証、および MinION によるシーケンシングデータからリアルタイムにゲノム配列を決定するバイオフィーマティクスツール RAMPART の検証を行った。改良法ではウイルス増幅用のプライマー配列が改良され、遺伝学的に異なる EBOV 株 (2014 年西アフリカ株、2018 年コンゴ民主共和国北キブ州株) から、シーケンシング 20 分後にドラフトゲノムを決定でき、更に分子系統解析により分離株の地域推定が可能であることを明らかにした。

### (3) ウイルスサーベイランスを目的としたナイロウイルス検出法の開発

CCHFV は、出血熱ウイルスの中でもアフリカからユーラシア大陸にかけて広範な流行域を持つことが特徴であり、エボラウイルス病の流行地域でも感染者が報告されている。CCHFV が属するブニヤウイルス目ナイロウイルス科のウイルスは現在 50 を超えるウイルス種がマダニや家畜、野生動物等から分離されており、少ないながら CCHFV 以外にもヒトへの感染が報告されているウイルスがある。本研究では semi-nested RT-PCR による網羅的ナイロウイルス検出法を新たに開発した。この方法は、現在同定されている遺伝子型のナイロウイルス株を検出でき、 $10^1$ - $10^3$  コピーのウイルス RNA を検出した。新たに開発した方法は、ナイロウイルスを網羅的かつ高感度に検出できることが分かった。更に PHE で保管する CCHFV 陽性マダニ及びヒト血液試料からのウイルス検出を試み、高い特異性で、かつリアルタイム RT-PCR と同程度の検出感度を得ることが分かった。このことから、不明熱症例からのウイルス検出法として、またナイロウイルスのサーベイランスを目的としたマダニや野生動物等からのウイルス検出法として有用であり、CCHFV の分子診断法としても応用可能だと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 黒崎 陽平	4. 巻 74
2. 論文標題 エボラ診断薬とその現場での役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 548-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pemba CM, Kurosaki Y, Yoshikawa R, Oloniniyi OK, Urata S, Sueyoshi M, Zadeh VR, Nwafor I, Iroezindu MO, Ajayi NA, Chukwubike CM, Chika-Igwenyi NM, Ndu AC, Nwidi DU, Maehira Y, Unigwe US, Ojide CK, Onwe EO, Yasuda J.	4. 巻 269
2. 論文標題 Development of an RT-LAMP assay for the detection of Lassa viruses in southeast and south-central Nigeria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virological Methods	6. 最初と最後の頁 30-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2019.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 C. Pemba, Y. Kurosaki, R. Yoshikawa, I. Nwafor, O. K. Oloniniyi, S. Urata, M. Sueyoshi, V. R. Zadeh, M. O. Iroezindu, N. Ajayi, C. M. Chukwubike, N. M. Chika-Igwenyi, A. C. Ndu, D. U. Nwidi, Y. Maehira, U. S. Unigwe, C. K. Ojide, E. O. Onwe, J. Yasuda
2. 発表標題 Development of an RT-LAMP assay for the detection of Lassa viruses in southeast and south-central Nigeria
3. 学会等名 Lassa fever First International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kurosaki, B. Afrough, J. Chamberlain, R. Hewson, J. Yasuda
2. 発表標題 Nanopore sequencing for genome surveillance of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kurosaki, O. Oloniniyi, C. Pemba, R. Yoshikawa, J. Yasuda
2. 発表標題 Next- and Third-generation sequencing for Lassa virus surveillance in Nigeria
3. 学会等名 The 17th Awaji International forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Kurosaki, M. T. Ueda, Y. Nakano, J. Yasuda, Y. Koyanagi, K. Sato, S. Nakagawa
2. 発表標題 DIFFERENT EFFECTS OF TWO MUTATIONS ON THE INFECTIVITY OF EBOLA VIRUS GLYCOPROTEIN IN NINE MAMMALIAN SPECIES
3. 学会等名 The 2018 Negative Strand RNA Virus meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ロジャー ヒューソン  (HEWSON Roger)	英国公衆衛生局・国立感染症研究所・教授	