

24. 兵庫県における原因不明集団胃腸炎事例の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

○島本 章義 (兵庫県立健康科学研究所)

【研究目的】

集団胃腸炎の原因調査において病原体の特定は不可欠であるが、検査項目が限られた通常の検査ではまれに病原体が検出されないことがある。次世代シーケンサー(以下、「NGS」という。)を用いた解析では、細菌、ウイルス等複数の遺伝子を網羅的に解析することで、原因不明検体から病原体を検出できる場合がある¹⁾。今回、当研究所に搬入された事例のうち原因不明となった検体について、NGSを用いたメタゲノム解析を実施し、原因を明らかにすることを目的とした。

【研究の必要性】

当県では、食中毒(疑い)の集団胃腸炎事例が発生すると、保健所で疫学調査を行い、患者の喫食状況、臨床症状、潜伏期間等から病原体を推定し、検査項目を設定し検査を行っている。食中毒(疑い)の検査は、当研究所では主にウイルス、寄生虫等を検査し、保健所に設置されている検査室では主に細菌検査が行われる。当研究所で行うウイルス検査は、国立感染症研究所が示す感染性胃腸炎の病原体検出マニュアル²⁾³⁾⁴⁾に準じて実施しているが原因が特定できないケースがあり、食中毒防止や拡大防止対策が困難な場合がある。実際、2018年4月から2023年3月までに当研究所で検査した食中毒(疑い)78事例のうち、11事例(14.1%)が原因不明となった。食中毒(疑い)検査は主にReal-time PCR法やconventional PCR法により行われており、これらの方法は検査対象となる遺伝子配列に特異的なプライマー、プローブを用いるため、病原微生物が検査対象でない場合や、プライマー、プローブの結合部位に変異を有する株は検出できない。NGSは、検体中に存在するDNAやRNAを網羅的に解読するメタゲノム解析を行うことができるため、遺伝子に特異的な塩基配列に頼らずに病原体を検出できる。2023年6月には、メタゲノム解析により茨城県で世界初となるオズウイルス感染症の症例が報告⁵⁾され、原因不明症例に対するメタゲノム解析の有用性が改めて示された。今回、原因不明検体から病原体の遺伝子を検出し、食中毒防止等の衛生対策に活かすことを目的としてメタゲノム解析を行った。

【研究計画】

研究方法：滅菌蒸留水を用いて10%乳剤とした糞便検体を12,000×g、10分、4℃で冷却遠心し、遠心上清からQIAamp Viral RNA Mini kit(QIAGEN)を用いて核酸抽出を行った。次いで、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina(New England Biolabs)を用いてRNAライブラリーを調整し、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina(Dual Index Primers Set 1)(New England Biolabs)によりインデックス配列を付加した。MiSeq Reagent Kit v2(300 Cycles)

(Illumina) を用いてリードデータを得た後、Base Space Sequence Hub (Illumina) を用いてアダプタートリミング、ホストゲノムの除去及びメタゲノム解析を行なった。病原微生物に分類されたリードが比較的多い検体については、conventional PCR 法により PCR 産物を作成し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。塩基配列の解析には、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて行った。

研究対象数：2018年4月から2023年3月までに食中毒（疑い）として当研究所に搬入された78事例779検体のうち、原因不明となった11事例の糞便25検体を対象とした。

【実施内容・結果】

原因不明となった11事例由来の糞便25検体について、メタゲノム解析を実施し、得られたリード数を表1に示した。*Campylobacter* は2事例3検体(検体番号18007, 19062, 19063), *Clostridium perfringens* は1事例1検体(検体番号22036), *Salmonella enterica* は1事例1検体(検体番号22048)において、総リード数に対して分類されたリード数の割合が1.00%以上になった。リード数は、*Campylobacter* においては、検体番号18007が5,169リード(3.42%), 検体番号19062が4,791リード(1.81%), 検体番号19063が1,951リード(2.09%)であった。*Clostridium perfringens* については、検体番号22036が2,953リード(1.06%), *Salmonella enterica* については、検体番号22048が725リード(2.19%)だった。*Campylobacter* の菌種については、*jejuni*, *coli* 等に分類されたリード数が少なかったため判別できなかった。また、*Clostridium perfringens* については菌種、*Salmonella enterica* については血清型の判別ができなかった。いずれの検体も細菌のリードが大半を占め、真核生物、ウイルスに分類されたリードは0.1%以下だった。また、ウイルスに分類されたリードの多くはファージ由来だった。

検体番号18007, 19062, 19063について、Gehua Wang らの⁶⁾の方法により *Campylobacter C.jejuni* *hip O* 遺伝子及び23S rRNA の conventional PCR を行ったところ、検体番号18007のみバンドが得られた。ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定しBLAST検索を行ったところ、2016年にアメリカ合衆国で検出された *Campylobacter jejuni* (Accession No CP125395) の塩基配列と96%の相同性が得られた。検体番号22036について、ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer Set CPE-1&2 (TaKaRa) により conventional PCR を行ったが、バンドは得られなかった。検体番号22048について、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1&2 (TaKaRa)、サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set STN-1&2 (TaKaRa) により conventional PCR を行ったが、バンドは得られなかった。

【考察と今後の課題】

原因不明となった11事例の糞便25検体についてメタゲノム解析を行ったところ、5検体(検体番号18007, 19062, 19063, 22036, 22048)について、病原性細菌に分類されたリード数が比較的多くなった。一般的に、食中毒細菌検査は菌を培養した後、生化学検査や遺伝子検査が行われるが、本研究では培養することなく、迅速に病原体由来のゲノム配列を検出することができた。しかしながら、メタゲノム解析のみでは菌種及び血清型の特定には至らなかった。

表1 メタゲノム解析により得られた各検体のリード数

Case	Sample No	Total Reads	Bacteria (Reads)	Eukaryota (Reads)	Viruses (Reads)	<i>Campylobacter</i> (Reads (%))	<i>Clostridium perfringens</i> (Reads (%))	<i>Salmonella enterica</i> (Reads (%))
1	18007	151,336	143,819	5		5,169 (3.42)		708 (0.47)
	18008	506,692	490,806	2	23	9 (0.00)	9 (0.00)	166 (0.03)
2	18437	683,878	651,754	1		13 (0.00)	3 (0.00)	170 (0.02)
	18438	439,647	425,147	1	1	5 (0.00)	9 (0.00)	493 (0.11)
3	19057	206,573	197,804	2	1	4 (0.00)	3 (0.00)	46 (0.02)
4	19062	264,496	254,948			4,791 (1.81)	1 (0.00)	307 (0.12)
	19063	93,513	88,564	1		1,951 (2.09)		1 (0.00)
5	20014	239,392	235,064		2	4 (0.00)	2 (0.00)	37 (0.02)
6	20015	202,678	189,534		17	4(0.00)		26 (0.01)
7	21009	209,867	189,842	8	5	12 (0.01)	5 (0.00)	45 (0.02)
	21010	161,482	93,447	23	15	20 (0.01)	3 (0.00)	76 (0.05)
	21011	198,254	190,858	1		4 (0.00)	22 (0.01)	201 (0.10)
	21012	189,105	178,109		4	18 (0.01)	3 (0.00)	113 (0.06)
	21013	532,207	516,778	3	14	171 (0.03)	1 (0.00)	151 (0.03)
	21014	197,187	168,964	13	2	53 (0.03)	2 (0.00)	32 (0.03)
	21015	146,968	143,897				1 (0.00)	75 (0.05)
8	21016	141,873	137,503		1	2 (0.00)	4 (0.00)	76 (0.05)
	22035	3,551	3,367			1 (0.03)		
9	22036	279,628	256,422			4 (0.00)	2,953 (1.06)	25 (0.01)
	22037	94,075	92,437				64 (0.07)	59 (0.06)
	22038	210,467	81,695	41		25 (0.01)	67 (0.03)	569 (0.27)
10	22048	33,056	32,147			78 (0.24)		725 (2.19)
11	22070	167,126	160,379		1	24 (0.01)	3 (0.00)	111 (0.07)
	22071	13,103	11,600		11		1 (0.01)	5 (0.04)
	22072	156,775	138,273	4		22 (0.01)		71 (0.05)

各検体とも細菌のリードがほとんどであり、真核生物、ウイルスに分類されたリードは極めて少なかった。これらの結果を踏まえ、糞便検体を解析する場合は、標的を細菌にする場合とウイルスにする場合でライブラリーの調整方法を変更することが効率的と考えられた。今後、ウイルスを標的とする場合は、細菌 rRNA の除去処理やウイルスゲノム以外の核酸を分解する方法⁷⁾等のライブラリー調整を検討し、糞便検体におけるメタゲノム解析の手法を確立したい。

【謝辞】

本研究を実施するにあたりご協力いただいた保健医療部生活衛生課，健康福祉事務所及び検体採取にご協力いただいた関係機関の皆様方に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 稲崎 倫子, 板持 雅恵, 名古屋 真弓, 佐賀 由美子, 稲畑 良, 滝澤 剛則, 小淵 正次 : 次世代シーケンサーを用いた食中毒疑い事例からのサポウイルス GV.2 の検出. 日本食品微生物学会雑誌. 35(2), 81-87 (2018)
- 2) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル ロタウイルス (第 2 版) (2019)
- 3) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル ノロウイルス (第 1 版) (2019)
- 4) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル サポウイルス (第 1 版) (2021)
- 5) 国立感染症研究所 : 初めて診断されたオズウイルス感染症患者. 病原微生物検出情報 (IASR), 44(7), 109-111 (2023)
- 6) Wang G, et al. : Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *Fetus*. J Clin Microbiol. 40(12), 4744-4747 (2002)
- 7) Tan SK, et al. : Metagenomic sequencing of stool samples in Bangladeshi infants: virome association with poliovirus shedding after oral poliovirus vaccination. Sci Rep. 10(1), 15392 (2020)

【経費使途明細】

使 途	金 額
NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina	129,200 円
BaseSpace Sequence Hub Professional Annual Subscription	66,120 円
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina(DualIndex PrimersSet1)	70,450 円
ユニラックジュニア S500-25B	4,860 円
PP チューブラック MR-25	2,098 円
消費税	27,272 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円