

国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析

齊木 大^{a, b}, 日向 綾子^c, 千葉 隆司^{a, c}, 久保田 寛顕^c, 鈴木 康規^c,
吉田 勲^d, 岡崎 輝江^d, 長谷川 道弥^d, 長島 真美^d, 根岸 あかね^d,
鈴木 愛^d, 栗田 さや子^d, 中山 愛子^a, 平井 昭彦^c, 秋場 哲哉^{a, e},
新開 敬行^d, 黒田 誠^f, 貞升 健志^c

2014年8月から10月にかけて、約70年ぶりにデング熱の大規模感染事例が東京で発生した。都内で発生した患者の血清および蚊から分離されたデングウイルス (DENV) 株および患者血清中のDENV遺伝子を次世代シーケンサー (NGS) で解析し、得られた塩基配列を国内感染事例の初発患者由来株の配列と比較検討した。

NGSでの解析によって患者から分離された6株、蚊から分離された7株のDENV遺伝子配列は、ほぼ全長の塩基配列が得られた。分離株と参照株では0~6塩基異なっていたが、分子系統樹上では同一クラスターを形成した。NGS解析で得られるデータ量はウイルス量に比例し、real-time PCR法でウイルス量を予め推定することにより、NGSで効率良く解析を行うことが出来ると考えられた。遺伝子解析により分離株で認めた変異の中には、患者血清中のDENVでは確認できない変異も存在した。今回の解析の結果、DENV全長を用いた塩基配列解析において患者由来株と代々木公園で捕集された蚊由来株が99.9~100%一致したことから、公園に生息していた蚊が国内感染の一因となったことが強く示唆された。

キーワード: デングウイルス, 蚊, 次世代シーケンサー, NGS, NGS解析, 血清検体

はじめに

デング熱はネッタイシマカやヒトスジシマカによって媒介される蚊媒介感染症である。現在、アジア、中南米等の熱帯・亜熱帯地域で広く流行しており、年間1億人近くの患者が発生している。デングウイルス (DENV) はフラビウイルス科に属し、4つの血清型 (1~4型) に分類され、各血清型のウイルスの遺伝子解析は感染地域を推定するための有用な情報源となる¹⁾。

2014年8月から10月にかけて、約70年ぶりにデング熱が国内で発生し¹⁻³⁾、全国で162例、都内で108例の患者が報告された。患者の多くは代々木公園またはその周辺で1型のDENVに感染したと推定され、代々木公園で捕集されたシマカ亜属からも1型のDENVが検出された^{1,4)}。患者血清由来DENVならびに蚊由来DENVのエンベロップ (E) 領域の塩基配列 (1,081bp) をダイレクトシーケンス法により解析したところ、系統樹解析では同一のクラスターを形成していた^{1,5)}。

今回、患者および公園の蚊からVero系細胞を用いて分離したDENVと患者血清から抽出したDENVを次世代シーケンサー (NGS) により解析し、得られた塩基配列を国内感染事例の初発患者由来株 (NIID100) と比較した。

実験方法

1. 検体

Vero系細胞を用いて分離したDENV 13株を供試した。内訳は患者血清由来6株および蚊由来7株である。患者の発病時期は、8月1検体、9月4検体、10月1検体、また蚊の採集時期は9月3日から17日の間であった。

さらに同患者血清6検体について、血清から抽出したRNAを材料に直接、NGS解析を行った。

2. 遺伝子抽出

細胞培養上清および患者血清140 μ LからQIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用してRNA抽出を行った。抽出工程は、ほぼキットのプロトコールに準拠したが、Carrier RNAを添加しないBuffer AVLを使用した。また、溶出にはBuffer AVEではなくEB Bufferを使用し、カラムを65°C5分加温した後に遠心処理を行った。

3. DENV real-time PCR

RNA抽出物を用いてDENV-1型を対象としたreal-time PCR法を行い検出サイクル数 (Ct値) を計測し、NGSで得られた塩基長を比較した。real-time PCR法は国立感染症研究所のデングウイルス感染症診断マニュアルに準拠した⁶⁾。

a 当時：東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

b 東京都市場衛生検査所 104-0045 東京都中央区築地5-2-1

c 東京都健康安全研究センター微生物部

d 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

e 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

f 国立感染症研究所 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

Table 1. Result of NGS and real-time PCR

	No	obtained	PCR	obtained	PCR
		genome data by NGS(bp)	(Ct)	genome data by NGS(bp)	(Ct)
virus strain			serum		
patient	1	10,682	12.7	10,475	27.6
	2	10,684	13.9	7,995	30.9
	3	10,683	13.9	8,698	30.4
	4	10,289	14.9	610	33.3
	5	10,290	14.5	10,441	27.4
	6	10,293	12.1	7,417	31.1
mosquito	1	10,290	12.5		
	2	10,683	12.7		
	3	10,428	14.8		
	4	10,525	13.6		
	5	10,549	13.6		
	6	10,682	13.3		
	7	10,684	14.3		

4. NGS解析

NGSのライブラリー作成にはScriptSeq v2 RNASeq Library Preparation Kit (epicentre) 等を用い, MiSeq (illumina) を使用して塩基配列を取得した. 得られたデータは国立感染症研究所が作成したVirusTap4⁷⁾を用いて解析し, 塩基配列を取得した.

患者および蚊由来株の塩基配列は, 国内感染事例の初発患者由来株(D1/Hu/Saitama/NIID100/2014株: LC011945)を参照株とし, 変異部位を解析するとともに, 遺伝子解析ソフトであるMEGA6を用いてEnvelope(E)領域と全長を系統樹解析により比較した.

結 果

1. NGSとreal-time PCRによる検出

NGS, real-time PCRいずれの方法においても供試したすべての検体で1型のDENV遺伝子を検出することができた. このうち, NGSでは13分離株および患者血清2検体からDENV遺伝子の全長約11kbpのうち, ほぼ10kbp以上の塩基配列が得られた.

real-time PCRとNGSの結果をTable 1に示した. PCRのCt値が小さいほど検体に含まれるウイルス量が多いことを示す. 分離株ではreal-time PCRのCt値が12~15サイクルであり, NGSではほぼ全長の塩基配列(10,290~10,684bp)が取得できた. 一方, 患者血清ではCt値は27.4~33.3サイクルであり, 27サイクル前後であった患者血清2検体では10,441bp, 10,475bpとほぼ全長が得られたが, Ct値30.9~31.1サイクルの血清3検体からは約7~9kbpの塩基配列しか得ることが出来ず, Ct値33サイクルの血清1検体では610bpとほとんど塩基配列を得ることが出来なかった.

2. NGSのデータ解析

分離株由来の各検体から得られた塩基配列のうち, すべてに共通の領域9,882塩基について, 参照株(D1/Hu/

Table 2. The number and position of point mutation

Saitama strain				patient						mosquito							
area		position	base	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Structural Proteins	preM	484	T							C							
		870	G							T						T	
	E	1263	C										N				
		1396	T														A
		1520	G														R
		1722	T											N			
1987		C				Y(-)											
2216	T											C					
Nonstructural Proteins	NS1	2491	A													G	
	NS2A	4090	T							C							
	NS2B	4305	A			C(A)											
	NS3	5917	C													Y	
	NS4B	6988	G						A(A)								
		7131	C				Y(-)									Y	Y
		7135	G								R						
		7151	G						R(G)								
		7152	T			Y(T)					Y	N	C			Y	
		7163	G														R
	7164	C				Y(-)											
	NS5	7557	C	Y(C)													
		7667	A											T			
8287		T					A(-)										
8380		T					Y(-)										
9289		A							G(G)								
10187		C				T											
No. of Variation				1	1	2	5	2	1	3	2	2	4	0	6	3	

(-):result by serum, (-):unmeasurable

形成し、遺伝子量の違いによって推定された感染時期の違いによる差も見られなかった。

今回解析した全ての分離株および参照株の間に0~6塩基の違いはあるものの、血清から得られたデータでは0~1塩基となったこと、DENV全長を用いた塩基配列解析で患者由来株と代々木公園で捕集された蚊由来株が99.9~100%一致したこと、全長の系統樹解析で同一クラスターに属したことから、公園の蚊が国内感染拡大の原因となったことが示された。

患者由来DENVにおいて分離株で混合塩基であった部位(7151,7152,7557)と4305は(Table 2)、患者血清中のDENVの塩基配列の解析結果とは異なり、すべて参照配列と一致していた。これらの変異はVero系細胞を用いて継代していく過程で生じた変異である可能性が考えられた。

また、分離株と患者血清の結果が同じものの、参照株とは異なる場所に変異が2ヶ所確認された。これらは変異したDENVに患者が罹患した、あるいは患者の体内でDENVが増殖する過程で変異が生じたこと等が考えられる。

複数の分離株に共通した変異のうち、患者由来株では検出されなかったPreM領域のG870Tの変異は蚊由来株のみに認められ、蚊の体内におけるDENV増殖時に特異的に生じた変異とも考えられ、興味深い結果となった。

国際化の進展とともに輸入感染症が国内に持ち込まれ、国内で感染が拡大する可能性が危惧されている。デング熱などの蚊媒介感染症において、海外感染例の患者から分離されたウイルスの塩基配列を日常的に集積し、分子系統樹解析を行うことは、国内感染が発生した場合に感染源の推定や伝播状況の把握のための基礎資料として有用であり、継続した塩基配列の解析は必要であると考えられる。

ま と め

都内で発生した患者の血清および蚊から分離されたDENVの塩基配列の全長をNGS解析により比較した結果、99.9~100%一致し、系統樹解析では参照株と同一のクラスターを形成していたことから、公園に生息していた蚊が国内感染の一因となったことが強く示唆された。

また、Vero系細胞を用いた分離株由来のNGS解析で認められた変異の中で、直接患者血清から解析した結果と異なる部位が存在したため、分離株の解析には注意が必要である。

文 献

- 1) 齊木 大, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 他: 東京健安研七年報, **67**, 27-35, 2016.
- 2) 関 なおみ, 岩下裕子, 本 涼子, 他: 日公衛誌, **62**, 238-250, 2015.
- 3) 井口智義, 高橋久美子, 辻 麻美, 他: 東京健安研七年報, **67**, 11-26, 2016.
- 4) 吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 他: 小児科, **57**, 395-400, 2016.

- 5) Ito M., Takasaki T., Kotaki A., *et al.*, Jpn. J. Infect. Dis, **63**, 181-184, 2010.
- 6) 国立感染症研究所: デングウイルス感染症診断マニュアル, <http://www.nih.go.jp/niid/images/labmanual/Dengue2014.pdf> (2017年8月23日現在, なお本URLは変更または末梢の可能性がある)
- 7) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M., Front. Microbiol., **7**, 1-5, 2016.

Molecular Epidemiological Analysis of Dengue Virus Isolated from Domestic Cases Using the Next Generation Sequencing

Dai SAIKI^{a,b}, Ayako HYUGA^c, Takashi CHIBA^c, Hiroaki KUBOTA^c, Yasunori SUZUKI^c, Isao YOSHIDA^c,
Terue OKAZAKI^c, Michiya HASEGAWA^c, Mami NAGASHIMA^c, Akane NEGISHI^c, Ai SUZUKI^c,
Sayako KURITA^c, Aiko NAKAYAMA^a, Akihiko HIRAI^c, Tetsuya AKIBA^c, Takayuki SHINKAI^c,
Makoto KURODA^d and Kenji SADAMASU^c

Between August and October 2014, a dengue outbreak occurred in Tokyo for the first time in over 70 years. Dengue virus (DENV) strains isolated from patients, mosquitoes, and dengue virus genes in patient sera were analyzed using next-generation sequencing (NGS). The resultant nucleotide sequences were compared with the sequence of the standard strain derived from the initial patient of the domestic cases.

Using NGS, nearly full-length nucleotide sequences from six strains were isolated from patients, and seven DENV gene sequences were isolated from mosquitoes. Although the isolates and reference strain differed by 06 bases, they clustered together on the constructed molecular phylogenetic tree. The amount of data obtained by NGS analysis is proportional to the viral load. Therefore, if the viral load is predicted in advance by real-time PCR, it is considered possible to conduct efficient analysis with NGS. Among the mutations found in isolates by gene analysis, some were not found in DENV of infected patient sera. It was therefore thought that the mutation had occurred during the isolation process. From the full-length sequences of the DENV strains derived from the patients, 99.9%–100% matched those of DENV strains derived from the mosquitoes collected in Yoyogi Park. Thus, it is strongly suggested that the mosquitoes inhabiting the Yoyogi Park are vectors of domestic DENV infection.

Keywords: dengue virus, mosquito, next generation sequencer (NGS), NGS analysis, patient's serum

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Wholesale Market Sanitary Inspection Station, 5-2-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

^c Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

^d National Institute of Infectious Disease, 1-23-1, Toyama-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

