

福岡市における RS ウイルスのゲノム解析 (2024 年度)

讃井武蔵・宮本道彦

福岡市保健環境研究所保健科学課

Genome Analysis of Respiratory Syncytial (RS) Virus in Fukuoka City (2024)

Musashi SANUI and Michihiko MIYAMOTO

Health Science Section, Fukuoka city Institute of Health and Environment

要約

RS ウイルスは、約 15,200 塩基から成る 1 本のマイナス鎖 RNA をゲノムとして有する呼吸器疾患起因ウイルスである。A 型及び B 型のサブグループに大別され、G 遺伝子の塩基配列から複数の遺伝子型に分類されるが、ゲノム解析を行うことでタンパク質中のアミノ酸変異検出及び系統 (Clade) 判定といったより詳細な解析が可能になる。ゲノム解析のためのライブラリー調製を検討し、次世代シーケンサーにより取得したデータについて解析を実施するため、Windows Subsystem for Linux 及び Ubuntu を利用した情報解析環境を構築した。構築した手法により、令和 6 年度福岡県結核・感染症発生動向調査事業において分離した RS ウイルスについて、サブグループごとに収集した参照配列に対してマッピングし、コンセンサス配列を作成した。Web アプリケーションである Next Clade にコンセンサス配列をアップロードし、解析したところ、16 株中 13 株について Clade の判定を行うことができた。さらに当所で得られた配列及び GISAID で収集した国内の配列を用いて系統樹を作成したところ、Next Clade 解析の結果と同様に分類された。

Key Words : RS ウイルス Respiratory syncytial virus, 次世代シーケンサー next generation sequencer, 情報解析 data analysis, ゲノム解析 genome analysis, 系統解析 phylogenetic analysis

1 はじめに

RS ウイルス (Respiratory syncytial virus) は、*Pneumovirus* 科 *orthopneumovirus* に属しており、ゲノムとして約 15,200 塩基から成る 1 本のマイナス鎖 RNA を持つウイルスである。

成人では重篤な呼吸器症状を呈することは少ないが、小児におけるウイルス性気道感染症の主要な病原体であり、特に生後 6 ヶ月未満の乳児が罹患すると、呼吸困難を伴う細気管支炎、肺炎等を発症することがある。

RS ウイルスは、表面膜タンパク質である G タンパク質の抗原性の違いから 2 つのサブグループ (A 型及び B 型) に大別され、さらに G 遺伝子の塩基配列から複数の遺伝子型に分類される。昨今、次世代シーケンサー (NGS) により得られたゲノム情報を元に、より詳細な系統 (Clade) に分類する方法が検討されている (<https://github.com/rsv-lineages>)。特定の遺伝子領域を対象とした遺伝子型分類と比較し、ゲノム解析を行うことで、詳細な解析が可能とな

ることが期待される。

本稿では、令和 6 年度福岡県結核・感染症発生動向調査事業における検査で分離した RS ウイルスについて、検討したゲノム解析手法及び得られた結果等について報告する。

2 実験方法

2.1 解析対象

福岡県結核・感染症発生動向調査事業において、令和 6 年度に小児科病原体定点等から搬入された臨床検体 (鼻咽頭ぬぐい液、鼻汁等) について、Hep-2 細胞等によるウイルス分離を行った。RS ウイルス分離陽性となった表 1 に示す分離株をゲノム解析の対象とした。

また、ウイルス分離陽性となった 16 株について、「病原体検出マニュアル ヒトオルソニューモウイルス (RS ウイルス) 第 4.0 版¹⁾」記載のサブグループ検出法を実施したところ、A 型が 15 株で、B 型が 1 株であった。

表1 解析の対象としたRSウイルス分離株

番号	サブグループ	分離前検体採取年月	診断名
No.1	A型	2024 May	RSウイルス感染症
No.2	A型	2024 May	RSウイルス感染症
No.3	A型	2024 May	RSウイルス感染症
No.4	A型	2024 Jun	RSウイルス感染症
No.5	A型	2024 Jun	RSウイルス感染症
No.6	A型	2024 Jun	RSウイルス感染症
No.7	A型	2024 Jul	RSウイルス感染症
No.8	A型	2024 Jul	RSウイルス感染症
No.9	A型	2024 Aug	RSウイルス感染症
No.10	A型	2024 Aug	RSウイルス感染症
No.11	A型	2024 Aug	RSウイルス感染症
No.12	A型	2024 Oct	RSウイルス感染症
No.13	A型	2024 Jan	RSウイルス感染症
No.14	B型	2024 Feb	無菌性髄膜炎
No.15	A型	2024 Feb	咽頭結膜熱
No.16	A型	2024 Mar	咽頭結膜熱

2.2 試薬・装置等

RSウイルス分離株からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出したRNAは、LunaScript RT SuperMix Kit (NEB) により逆転写を行い、逆転写産物 (cDNA) の増幅は、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) を用いた。得られたcDNAは、Xiaominらの報告²⁾を参考に、RSウイルスゲノムを6つのセグメントに分割するよう設計されたプライマーを用いて増幅し、各セグメントの増幅産物を1本のチューブにプールした。ライブラリー調製は、QIAseq FX DNA Library CDI Kit (QIAGEN) により、断片化、アダプター付加及びライブラリー増幅反応を行い、ライブラリーの精製は、Agencourt

AMPure XP (BECKMAN COULTER) を用いた。調製したライブラリーは、iSeq 100 (illumina) でシーケンシングを行い、塩基配列 (fastq ファイル) を取得した。

2.3 情報解析

2.3.1 ゲノム解析

NGS から得られたデータは、Windows Subsystem for Linux (以下、「WSL」とする。) で解析を行った。ディストリビューションはUbuntu 24.04 LTS を用いた。

インストールしたコマンド等で図1のとおりにスクリプトを作成した。WSL上でスクリプトを実行し、参照配列へのマッピング、参照配列からの変異検出及びコンセンサス配列の作成を行った。なお、ゲノム Coverage (depth) が0であった部分は「N」としてコンセンサス配列を作成している。マッピング用の参照配列は、A型をNC_038235、B型をNC_001781とし、NCBI (National Center for Biotechnology Information : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) から塩基配列 (fasta ファイル) を取得した。

2.3.2 Clade 解析

2.3.1 で得られた配列を NextClade (<https://clades.nextstrain.org/>) にアップロードし、ゲノム解析の精度、Clade 等を確認した。

なお、この解析に用いた「reference dataset」は、A型が「A/England/397/2017」、B型が「B/Australia/VIC-RCH056/2019」である。

2.3.3 系統樹解析

GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data : <<https://gisaid.org>>) に登録されている2024年の4月から8月までに国内で採取されたRSウイルス (A型) の配列データを取得した。当該データ及び2.3.1で得られた配列のうち、ウイルス分離前検体が同時期に採取されているもの (No.1~No.11 (No.2は除く)) と合わせて系統樹を作成した (近隣結合法, Boot Strap 値 : 1000)。

なお、系統樹作成には塩基配列解析ソフトウェアMEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version10を用いた。

```
fastp -i [分離株名]_R1.fastq -I [分離株名]_R2.fastq -o [分離株名]-R1(trim).fastq -O [分離株名]-R2(trim).fastq -q 30 --cut_mean_quality 30 -l 20 --detect_adapter_for_pe
-h report.html -j report.json --cut_front --cut_tail --cut_right
bwa index [参照配列].fasta
bwa mem [参照配列].fasta [分離株名]-R1(trim).fastq [分離株名]-R2(trim).fastq > [分離株名].sam
samtools view -bS [分離株名].sam > [分離株名].bam
samtools sort [分離株名].bam -o [分離株名].sorted.bam
samtools index [分離株名].sorted.bam
samtools depth -a [分離株名].sorted.bam | awk '$3 == 0 {print $1, $2-1, $2}' > uncovered_regions.bed
bcftools mpileup -Ou -f [参照配列].fasta [分離株名].sorted.bam | bcftools call -mv -Oz -o [分離株名]variants.vcf.gz
bcftools index [分離株名]variants.vcf.gz
bcftools consensus -f [参照配列].fasta -m uncovered_regions.bed [分離株名]variants.vcf.gz > [分離株名]consensus.fasta
sed -i '1s/./N/' [分離株名] [分離株名]consensus.fasta
```

図1 ゲノム解析 (マッピング) 実行コマンド

3 実験結果及び考察

ゲノム解析を実施した 16 件の分離株について、Next Clade の解析結果を表 2 に示す。ゲノム coverage (%) が 90% 以上かつ混合塩基 (N を除く) が 10 以下のものを系統の判定に使用できるものとし、解析を行った 16 株のうち、13 株以上が 90% 以上のゲノム coverage (%) を示した。また、混合塩基 (N を除く) も 15 株が 10 以下であった。

しかし、サブグループ検出法 (リアルタイム RT-PCR) において、Ct 値が 30 を超えた株は、塩基の欠損 (N) が多く、Clade が判定されなかった。Ct 値が高くなった原因として、ウイルス分離時の増殖が不十分であったことが考えられる。

解析した分離株の Clade は、「A.D (A.3.1.1)」が 3 株、

「A.D」から G タンパク質の「L142S」変異等を獲得した「A.D.1」及びその下位系統「A.D.1.4」がそれぞれ 1 株、F タンパク質の「T12I」、G タンパク質の「T113I」変異等を獲得した「A.D.3」が 4 株並びに L タンパク質の「N1723G」変異等を獲得した「A.D.5」の下位系統「A.D.5.2」が 2 株確認できたが、採取時期による系統の偏りは認められなかった。

また、2.3.3 で作成した系統樹を図 2 に示す。分離株及び GISAID に登録されている RS ウイルス配列は、Next Clade で解析した結果と同様に分類された。2024 年の 4 月から 8 月までの GISAID 登録配列には、「A.D」系統はなかったが、福岡市のみ「A.D」が検出されている。しかし、本系統は過去に国内で既に検出されている系統であった。

表 2 Next Clade 解析結果

	Ct 値 (PCR)	ゲノム Coverage (%)	混合塩基 (N を除く)	N	Clade
No.1	14.6	99.8	6	53	A.D.3
No.2	30.5	82.2	29	2676	—
No.3	13.0	99.8	3	32	A.D
No.4	14.6	99.6	6	53	A.D.3
No.5	14.1	99.6	7	53	A.D.3
No.6	14.1	99.6	4	53	A.D
No.7	13.3	99.7	5	46	A.D.5.2
No.8	14.6	99.8	3	32	A.D
No.9	15.6	88.7	5	1715	—
No.10	14.7	99.7	6	46	A.D.5.2
No.11	12.3	99.8	5	32	A.D.3
No.12	11.8	99.8	4	32	A.D.1
No.13	14.6	99.6	2	60	A.D.5.2
No.14	13.4	100	3	0	B.D.E.1
No.15	13.9	99.8	3	30	A.D.1.4
No.16	34.2	4.4	4	14549	—

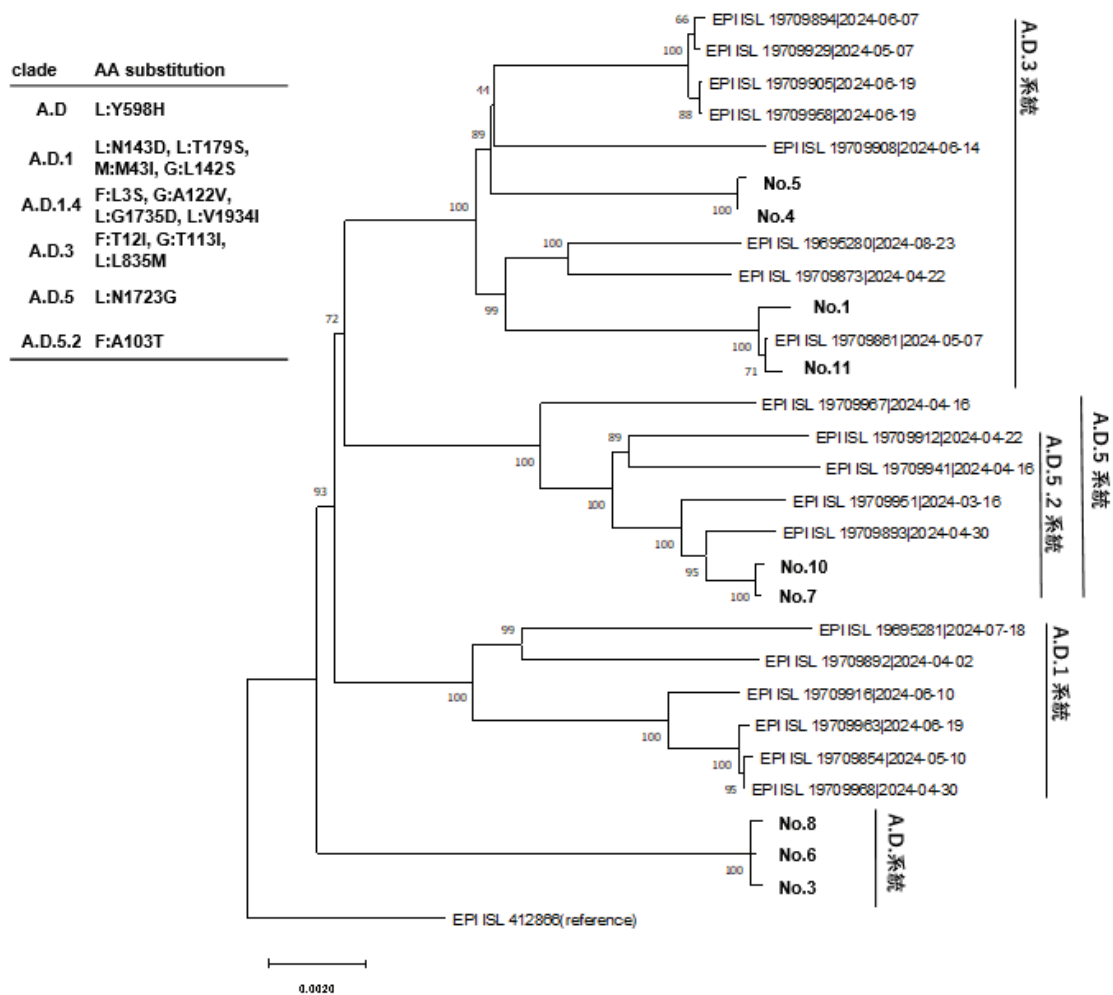


図2 RSウイルスの系統樹解析結果

4 まとめ

当所では、NGSを活用するため、昨年度から新型コロナウイルス以外のウイルスについて、ゲノム解析手法の検討を行っており³⁾、インフルエンザウイルス及びRSウイルスの分離株について、ゲノム解析を実施し、従来の遺伝子型別よりも詳細な系統の判定を行うことができた。国内におけるRSウイルスのGISAID等の登録数が少ないことが課題として挙げられるが、新型コロナウイルスやインフルエンザウイルスと同様に全国的にデータを集積することで、正確な流行把握が可能となることが期待される。

令和7年度からは、新たに急性呼吸器感染症サーベイランスが開始されるが、本市は、呼吸器系ウイルスによる流行が近隣の県市町村に先行するケースがこれまで多く、新規変異株の探知等につながるため、ゲノム解析による病原体の詳細な把握を継続することは重要である。

今後は、ゲノム解析結果の迅速性を向上させるため、

分離株を用いたゲノム解析と並行して急性呼吸器感染症のPCR陽性検体の抽出RNAからダイレクトにゲノム解析を行う方法を検討したい。また、本市における感染症サーベイランスに広く貢献するため、ゲノムを活用した解析等の結果を保健所、市民、医療機関等へ適切な形で情報発信していく必要がある。

文献

- 1) 国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター：病原体検出マニュアル ヒトオロソニューモウイルス（RSウイルス）第4.0版，令和5年8月
- 2) Xiaomin Dong, et.al : A simplified, amplicon-based method for whole genome sequencing of human respiratory syncytial viruses, Journal of Clinical Virology, 161, 105423, April 2023
- 3) 讃井武蔵，他：福岡市におけるインフルエンザウイルスのゲノム解析，福岡市保健環境研究所報，49，80～85，2024