

## 調査・研究終了報告書

研究分野：保健

調査・研究名	次世代シークエンサーを用いた原因不明感染症等の起因病原体の探知強化に向けた研究
研究者名（所属） ※印:研究代表者	○小林孝行、吉富秀亮、金藤有里、古谷貴志、濱崎光宏（ウイルス課）、中村麻子（生活化学課）、上田紗織、芦塚由紀（病理細菌課）
本庁関係部・課	保健医療介護部ワンヘルス総合推進課、がん感染症疾病対策課 環境部自然環境課
調査・研究期間	令和4年度～令和6年度（3年間）
調査・研究区分	1. 種類      ■行政研究      □課題研究 □共同研究（共同機関名：） □受託研究（委託機関名：） 2. 目的      ■基礎研究      □応用研究      □開発研究
福岡県総合計画	基本方向：感染症や災害に負けない強靭な社会をつくる 中項目：感染症対策の推進 小項目：感染症対策の推進
ワンヘルス実践6つの柱	柱1 「人獣共通感染症対策」
ワンヘルス研究の位置づけ	本研究は、主にダニが媒介する人獣共通感染症について、ヒト、動物、環境（媒介生物）を一体的に調査対象とした研究であり、その関係性を考察し、対策を検討するという観点から、ワンヘルス研究に位置づけられる。
福岡県環境総合ビジョン（第五次福岡県環境総合基本計画） ※環境関係のみ	柱： テーマ：
外部研究資金	■採択（2022年度 公益財団法人大下財団研究助成、科学研究費助成事業 基盤研究C）
キーワード	① 次世代シークエンサー ② 原因不明感染症 ③ 起因病原体 ④ 遺伝子解析
研究内容	
<p><b>1) 背景、目的及び必要性</b></p> <p>当所では感染症発生動向調査や行政依頼検査などにより様々な検体が搬入され検査を行っているが、中には症状があるにもかかわらず病原体が検出されない事例が多くある。こうした原因不明感染症における病原体の検出率を向上させ、実験室診断の機能を強化することは行政的に重要な課題である。そこで本研究では、次世代シークエンサー（NGS）を用いた病原体の網羅的な検出方法及び解析法の構築を行い、原因不明感染症における病原体を究明することを目的とした。また、得られた結果をもとに、病原体検出をより確実にするため、既存の検査法の改良または新たな検査法の開発を行った。</p>	
<p><b>2) 概要</b></p> <p>本研究では主に以下の3つの内容を実施した。</p> <p>① NGSを用いた病原体の網羅的な検出方法及び解析法を構築し、原因不明感染症における病原体の検出率の向上を目指した。</p> <p>② 既存の検査で陰性となった検体についてNGSを用いた病原体の網羅的な検出と解析を行い、これまで把握できていなかつた県内で流行している病原体の探知、遺伝学的特徴の把握を行った。</p> <p>③ 検出された病原体の遺伝子配列の情報をもとに、既存の検査法の改良または新たな検査法の開発を行った。</p>	
<p><b>3) 達成度及び得られた成果</b></p> <p>① 臨床検体におけるRNA-seq及びキャプチャープローブ法を用いたNGSによる起因病原体の網羅的な検出方法を構築したことにより、原因不明感染症において、病原体の検出が可能となった。また、マダニなどの媒介生物を対象とした病原体の網羅的な検出方法も同時に構築することができた。</p> <p>② 令和5年度に感染性胃腸炎の検体として搬入され、胃腸炎ウイルスの検査で陰性となった20検体について、NGSで起因病原体の網羅的な検出を行った結果、1検体からヒトアストロウイルス（HAstV）MLB型が検出された。HAstVは、classic型、MLB型及びVA型に分類される。当課で使用しているプライマーセットではMLB型及びVA型のHAstVが検出できないことから、新たにMLB型及びVA型を検出することができるプライマーセットを導入し、平成30年から令和4年にかけて県内で採取された検体を対象にHAstVの流行状況を調査した。その結果、381検体の糞便検体のうち27検体からHAstVが検出され、従来の検査系では検出できなかったMLBやVAも確認された。これにより、これらの遺伝子型が福岡県内で流行していたことが明らかとなった。</p> <p>ダニ媒介感染症疑い症例における21事例43検体の臨床検体について、NGSによる起因病原体の網羅的な検出を行った結果、SFTSウイルス、<i>Rickettsia japonica</i>、ライノウイルスC型が各1事例から検出され、従来の検査法では検出が困難な症例も存在し得ることを示した。また、県内で採取したマダニ470匹を115プール検体について、NGSによる起因病原体の網羅的な検出を行った結果、国外でヒトへの病原性が報告されているJingmen tick virus (JMTV) が検出され、特にタカサゴキラマダニは最小感染率21.1%と高い保有率を示した。これらのことから、本研究で構築したNGSによる起因病原体の網羅的な検出方法は、様々な臨床検体やマダニに使用することが可能であることが確認された。</p>	

③ 福岡県内のマダニからヒトへの病原性が報告されているJMTVが検出されたため、JMTVの県内における浸淫状況を把握するため、低コストかつ迅速に血中のウイルス検査ができる手法として、CRISPR-Cas12aと組み合せた特異度の高い検査法を開発した。この方法を用いて、野生動物（イノシシ及びシカ）に対するJMTVの浸淫状況を調査した結果、野生動物であるシカ2.4%、イノシシ13.2%で高いウイルス保有率を示し、県内の野生動物に可能性が示唆された。CRISPR-Cas12aと組み合せた検査手法の開発は、JMTVに限らず、他のウイルスにも応用可能であり、検査体制の強化に寄与する技術的成果となった。

#### 4) 県民の健康の保持又は環境の保全への貢献

NGSを用いた病原体検出および解析法の構築は、原因不明感染症や新興感染症に対する迅速な対応および感染拡大抑制に貢献し、県民の健康保持に寄与すると考えられる。また、本研究によりJMTVをはじめとする病原体の県内での存在が明らかとなり、リスク評価や将来の患者発生に備えた対策強化に資するものと考えられる。

#### 5) 調査・研究結果の独創性、新規性

ダニ媒介感染症に関わるリケッチャや細菌、新規ダニ媒介ウイルスに対応したプローブを設計し、これら病原体を包括的に検出可能なキャプチャープローブ法による検出系を構築した点に新規性がある。また、新規ダニ媒介ウイルスであるJMTVについて、県内における存在を明らかにするとともに、マダニおよび野生動物における高い保有率を示し、本病原体の地域内での感染拡大リスクを初めて示したことも重要な成果であると考えられる。さらに、JMTVに対してCRISPR-CasとLAMP法を組み合わせた低コストかつ高特異度の検査法を開発した点に独自性がある。

#### 6) 成果の活用状況

共同研究を実施した九州各県の地方衛生研究所に対し、NGSを用いた病原体の検出系および解析法の技術移転を行い、各機関における検査体制の強化に貢献した。

#### 7) 当該調査・研究課題に関する発表等

##### ① 行政に対する情報提供

- ・九州衛生環境技術協議会（2024）における九州各県の地方衛生研究所の担当者への情報提供
- ・県内保健環境研究所合同発表会（2023）における北九州市、福岡市の担当者への情報提供

##### ② 県民への情報提供

- ・保健環境研究所ホームページのトピックスへの掲載（「小児の原因不明急性肝炎検体における次世代シークエンサーを用いた起因ウイルスの網羅的探索」）による情報提供
- ・有害鳥獣捕獲従事者安全研修会（2024）におけるダニ媒介感染症に関する情報提供
- ・志免町立保育園職員研修会（2024）における感染症及びマダニに関する情報提供

##### ③ 学会誌掲載、学会発表

論文・報告等

- ・Nakamura A, Ashizuka Y, Kobayashi T, et al. Detection of Respiratory Viruses in SARS-CoV-2-Negative Specimens from January to March 2020 in Fukuoka, Japan. JJID,75(6),627-630,2022.
- ・Kobayashi T, Ashizuka Y. Detection of host vertebrate DNA in tick species collected from vegetation in Fukuoka, Japan. JJID (in press).
- ・上田紗織 小林孝行 中村麻子 金藤有里 芦塚由紀：福岡県におけるヒトアストロウイルスの包括的検出と流行状況の把握（2018～2022年），病原微生物検出情報（IASR），Vol. 45, p47-49.

学会発表

- ・中村麻子，金藤有里，小林孝行 ほか：小児の原因不明急性肝炎検体における次世代シークエンサーを用いた起因ウイルスの網羅的探索，第70回 福岡県公衆衛生学会（福岡），2023年5月
- ・上田紗織：福岡県におけるclassic、MLB、VAを含むアストロウイルスの検出状況について（2019年～2022年），ウイルス性下痢症研究会第34回学術集会（宮城），2023年9月
- ・中村麻子，金藤有里，小林孝行 ほか：小児の原因不明急性肝炎症例における起因ウイルスの網羅的探索および分子疫学解析，第70回 ウィルス学会学術集会（宮城），2023年9月
- ・小林孝行，芦塚由紀，金藤有里ほか：福岡県におけるマダニからのJingmen tick virusの検出，日本衛生動物学会 南日本支部合同大会2023（福岡），2023年10月
- ・芦塚由紀，小林孝行，吉富秀亮：福岡県内のマダニ相と野生動物および環境要因との関連性解析，第33回 日本ダニ学会（静岡），2024年9月
- ・金藤有里，吉富秀亮，小林孝行：CRISPR-Cas12a-LAMP法を用いた野生動物血清からのJMTV検出法の開発，第16回 LAMP研究会（東京），2025年3月
- ・吉富秀亮，金藤有里，小林孝行：CRISPR-Cas12a-LAMP法を用いたヒト血清からのSFTSウイルス検出法の開発，第16回 LAMP研究会（東京），2025年3月
- ・小林孝行，吉富秀亮，金藤有里ほか：福岡県におけるマダニからのウイルスの網羅的探索および野生動物のJingmen tick virus保有調査，第77回 日本衛生動物学会大会（長崎），2025年4月

##### ④ その他

特になし

#### 8) 研究経費

③外部研究費(その他) 令和4年度【 金額：1,000千円， 研究費名：2022年度大下財団研究助成「感染症媒介動物及び外来動物」】  
令和5年-7年度【 金額：4,860千円， 研究費名：科学研究費助成事業 基盤研究C】

#### 9) 備考

特になし