

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21140

研究課題名(和文)メタゲノム解析における高感度ウイルス検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive method for detection of viruses using the metagenome analysis

研究代表者

元岡 大祐 (Motooka, Daisuke)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：10636830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検体からの網羅的な病原体探索法として、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析法が利用されている。しかし、臨床検体中に含まれる全核酸のうち病原体由来の核酸分子は、非常に少なく、検出感度向上、低コスト化や解析の高速化を難しくしている。そのため本研究では、臨床検体中における病原体の濃縮法の開発に取り組み、より高感度、迅速かつ安価な病原体検出法の確立を目指した。主にカラムによるウイルス濃縮・精製法と宿主由来遊離核酸の効率的な除去方法の開発に取り組んだ。ノロウイルスやインフルエンザウイルスなどについて検討を行い、メタゲノム解析を行った結果、最終的に100倍以上のウイルス濃縮に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症対策における臨床検体中の病原体を探索する方法として、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析法が利用されている。本研究では、臨床検体中のウイルスの濃縮法開発に取り組み、カラム精製法や遊離核酸除去法を検討し、100倍以上のウイルス濃縮に成功した。高感度、迅速かつ安価な病原体検出法の確立に必須の技術であり、網羅的な病原体探索法の臨床応用にとって有用な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Clinical metagenomics using high-throughput sequencing is widely applied to comprehensively detect pathogens in infectious diseases. The pathogen identification approach is based on a similarity search of known nucleotides along with taxonomic assignment of sequence reads produced by high-throughput sequencing. However, because the relative abundance of pathogens in the sequence reads is very low (generally < 0.1%), we need to sequence massive numbers of reads to detect pathogens. Consequently, it is difficult to improve sensitivity, cut cost, and accelerate data analysis. To resolve this problem, we developed a highly sensitive method to detect pathogenic viruses from metagenomics data. We performed experiments to concentrate and purify several types of viruses (e.g., influenza virus) from culture supernatants or clinical samples using a hydroxyapatite column and succeeded in obtaining a maximum of 256-fold concentration of the viruses.

研究分野：生命情報科学

キーワード：メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症は高い死因の1つであり、マラリア、下痢症、HIV/AIDSや肺感染症などが主な原因となっている。特に発展途上国における全死亡の1/3が15歳未満の子供であり、その大部分は感染症が死亡要因である。それゆえ、感染症の病原体(細菌、ウイルス、真菌や原虫など)を迅速に検出・同定し、感染症の診断および対策を施すことが重要である。本研究の目的は、感染症が疑われる臨床検体から、病原性微生物を迅速に検出・同定する手法の構築である。

病原体同定法としては主に、分離・培養、形態観察やPCR法などが行われているが、それぞれの微生物に適した手法を用いる必要がある。またマイクロアレイ法では、既知の細菌とウイルスの数万種を同時に検査できるキットも発売されているが、全ての細菌やウイルスには対応しておらず、また真菌や原虫などにも対応していないため網羅性に欠ける。一方で、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析法は、病原体ごとに異なる処理が必要なく、臨床検体中の遺伝情報を網羅的に探索することで、全ての既知の病原体はもちろん、未知の病原体をも検出・同定し得るものである。これまでにメタゲノム解析により、呼吸器感染症患者の咽頭ぬぐいから、Influenza A virus、MetapneumovirusやCoronavirus、またそれらの共感染の検出、培養法にて陰性の心内膜炎患者の大動脈弁から *S. sanguinis* の検出に成功しており、メタゲノム解析による病原体同定法を確立しつつある。

しかし、臨床応用を目指した低コスト化・高速化には、臨床検体中の大部分を占める宿主由来の核酸が病原体検出の弊害となっている。例えば、*E. faecalis* による感染性心内膜炎患者の血液検体に対する解析から得られた全900万配列のうち、99.5%以上がヒト由来であり、*E. faecalis* 由来の配列は、わずか0.07%であった。また、Coronavirusによる呼吸器感染症患者の咽頭ぬぐい検体に対する解析では、全730万配列のうち病原体由来の配列は、わずか0.005%であった。本手法では、臨床検体中の核酸配列を網羅的に解読するため、得られるデータ量は、検体中に存在する生物のゲノムサイズとそのコピー数の積に比例する。そのため、上述例のような検出効率しか得られず、効率的な病原体検出には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、原因不明疾患の患者の臨床検体から網羅的かつ迅速な病原体の検出・同定を行い、感染症の原因を解明することを目的とする。しかし、上述のように病原体由来の配列は、わずかしか得られず、効率的な病原体検出には至っていない。本手法の病原体の検出感度の向上、低コスト化とデータ解析の高速化に向けて、主に臨床検体中における病原体の濃縮法の開発が課題である。ゲノムサイズとデータ量の関係から、ヒト由来核酸の混入量を僅かに減らすだけでも大幅な感度向上へと繋がるため、本課題の解決は、メタゲノム解析による病原体同定の低コスト化・臨床応用に向けた必須事項である。そこで本研究では、臨床検体中における微生物(特にウイルス)のより簡便で効率的な濃縮法の開発に焦点を当てた。

3. 研究の方法

カラムによるウイルス濃縮の条件について検討するとともに前処理法の検討を行った。また、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、濃縮効率について解析した。

(1) ハイドロキシアパタイト(HAp)カラムを用いたウイルス濃縮・精製法の開発

本研究では、抗体やウイルスに吸着することが知られるハイドロキシアパタイト(HAp)を用いた。また、研究設備が十分でない場所においても利用できるように、カラム精製法としてスピカラムでまずは検討を行った。

まず、ノロウイルス陽性糞便を用いて、ノロウイルスの濃縮に取り組んだ。リン酸緩衝液の濃度勾配による、ウイルスの吸着・洗浄・溶出を行い、濃縮効率についてノロウイルスと糞便中に大量に存在する細菌由来の16S rRNA 遺伝子量についてリアルタイムPCR法で定量した。また、同様の方法にて、培養したインフルエンザウイルス(H1N1やH3N2)およびC型肝炎ウイルス(HCV)についても濃縮実験を行った。なお、インフルエンザウイルスの濃縮率は赤血球凝集反応により確認し、HCVの濃縮率はリアルタイムPCRで確認した。また、精製度をあげるために液体クロマトグラフィーによるウイルス精製法の確立にも取り組んだ。サンプルは、培養したインフルエンザウイルス(H1N1とH3N2)とHCVを用いた。ハイドロキシアパタイトを担体とした高速液体クロマトグラフィー用のカラムを作成し、スピカラムと同様にリン酸緩衝液の濃度勾配により溶出を行い、1分ごとの溶出液を別々に分取した。それぞれについて赤血球凝集反応やリアルタイムPCRにより濃縮率や溶出時間の解析を行った。

(2) 臨床検体中のウイルスを濃縮するための前処理法の検討

臨床検体中には、宿主細胞や宿主由来の遊離核酸が大量に存在する。そのため、例えばゲノムサイズ10 kbのウイルスが 10^5 コピー存在したとしても、その総塩基長は1 Gbであり、ヒトゲノム1細胞分(3 Gb)の1/3のデータ量しかない。宿主由来核酸を効率的に除去することで、感度の向上が見込まれる。

まず、臨床検体中の宿主由来ゲノムDNAの除去を目指して、ゲノムメチル化サイト認識酵素を用いた濃縮を検討した。DNA中のCpGアイランドと呼ばれる配列が、特に高等生物でメチル化を受けていることはよく知られている。宿主と微生物ゲノムにおけるメチル化の違いを

対象にし、メチル化依存性 DNA 切断酵素(DpnI や MspJI など)を用いることで効率的に宿主由来の核酸を除去することが出来る。これらの酵素を用いてインフルエンザウイルス陽性検体に対して、濃縮を行った。

また上記とは異なる酵素による臨床検体の前処理方法として、DNaseI 処理による遊離核酸の除去が、病原体の濃縮にどの程度有用であるのかを検討した。ノロウイルス陽性糞便検体を用いて、検体に対する DNaseI 処理の有無、抽出 RNA の DNaseI 処理の有無について検討を行った。

(3)メタゲノム解析による病原体のシーケンス

ウイルス濃縮済み臨床検体について、次世代シーケンサーを用いてメタゲノム解析を行い、濃縮効率の評価を行った。ノロウイルス陽性糞便検体を用いて、上述の種々の濃縮作業を行った後、抽出した RNA からイルミナライブラリを調製した。その後、イルミナ社 HiSeq2500 を用いて、ショットガンシーケンスを行った。得られた配列の生物種アノテーションは、マッピングおよび BLAST による同源性検索により行った。

4. 研究成果

ハイドロキシアパタイトを担体に用いたスピнкаラムによるウイルス濃縮・精製法において、糞便中のノロウイルスの濃縮では、各溶出画分から抽出した RNA 毎に、16S rRNA 遺伝子に対するノロウイルスの RNA 量比をリアルタイム PCR により見積もったところ、最大で約 256 倍のウイルス濃縮ができていることが確認できた。また、培養したインフルエンザウイルス(H1N1、H3N2)や C 型肝炎ウイルス(HCV)についても、同様の実験を行ったところ、インフルエンザウイルスでは数倍の濃縮が可能であったが、HCV はカラムへの吸着が強いのか、ほとんどカラムから溶出されなかった。また、液体クロマトグラフィーによるウイルスの精製法では、スピнкаラムと同様、インフルエンザウイルス及び HCV を用いて溶出条件などの検討を行い、インフルエンザウイルスでは、スピнкаラムと同様にウイルス濃縮ができた。また、同じインフルエンザウイルスでも H1N1 と H3N2 では、溶出条件が異なることが明らかとなった。一方で、HCV はウイルスの濃縮はされていなかったが、特定の画分においてのみウイルスが回収できており、ハイドロキシアパタイトによるウイルス精製の有効性が確認できた。ただ、溶出時間の遅いものは、リン酸緩衝溶液のリン酸濃度が高くなることに依る UV 吸収が大きいため、吸光度計による検出が難しいということが今後の課題となった。

臨床検体の前処理方法の検討において、糞便中のノロウイルスの濃縮では、宿主由来のゲノム DNA を除去することを目的として用いた DpnI や MspJI 処理では、ウイルスの濃縮効果は見られなかった。またメタゲノム解析を行ったところ、環境中で多くみられる、*Pseudomonas* 属の細菌などが処理済みサンプルから多くシーケンスされており、操作過程が多くなることによるコンタミネーションの弊害が大きかったことがわかった。DNaseI を用いた遊離核酸の除去法による前処理において、ノロウイルス陽性検体を用いたウイルス濃縮では、リアルタイム PCR による確認では、臨床検体に依存するものの、2~100 倍の濃縮ができていることがわかった。また濃縮効率の良かった検体について、メタゲノム解析を行ったところ、臨床検体と抽出後の RNA に対して 2 回 DnaseI 処理を行った場合に、最もウイルス濃縮効率がよく、抽出後の RNA に対して DNaseI 処理を行った場合と比べると 100 倍以上のウイルス由来リードを取得できた(表 1)。臨床検体の状態に大きく依存するものの、ノロウイルス陽性便を用いた場合には本手法が有効であることがわかった。

表 1. 前処理方法の違いによるノロウイルス由来リード数の変化

前処理方法	全リード数	ヒト	細菌	ノロウイルス	その他
RNA 抽出->DNaseI	6,735,395	16,181	5,728,289	15,543	975,382
DNaseI->RNA 抽出	5,748,796	45,522	2,313,950	905,192	2,484,132
DNaseI->RNA 抽出->DnaseI	5,784,077	41,808	1,922,812	1,854,236	1,965,221

本研究課題にて行った実験より、臨床検体中のウイルスの濃縮については、ハイドロキシアパタイトを担体としたカラムによる濃縮と DNaseI による複数回の遊離核酸の除去が非常に有用であることが明らかとなった。最終的に 100 倍以上のウイルス濃縮に成功しており、シーケンスコストを抑えられるというだけでなく、多くのリードを得ることで、ウイルスゲノム全体の配列情報を明らかにできるというメリットがある。従来の方法では、病原体由来の配列が全リードの 1%以下であったものが、30%を超えている。病原体検出という目的では、より少ないリード数でも解析ができることから、従来よりもハイスループットにかつ、コストを抑えることができるようになった。カラムによるウイルス精製は、カラム径を細くするなど、感度向上を目指して検討できることがあるため、さらなる濃縮効率の改善を今後の課題としたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tao C, Kinoshita N, Shoji K, Motooka D, Nakamura S, Eura R, Ueoka K, Kubota M, Ishiguro A, Miyairi I. Urinary tract infection due to anaerobic bacteria in a two-month-old infant. *J Infect Chemother*. 査読有 2019 May;25(5):368-370. doi: 10.1016/j.jiac.2018.11.016. Epub 2019 Jan 25. PubMed PMID: 30686700.

Uda K, Koyama-Wakai C, Shoji K, Iwase N, Motooka D, Nakamura S, Miyairi I. WU polyomavirus detected in children with severe respiratory failure. *J Clin Virol*. 査読有 2018 Oct;107:25-28. doi: 10.1016/j.jcv.2018.08.003. Epub 2018 Aug 9. PubMed PMID: 30114678.

Yoshizawa H, Motooka D, Katada R, Matsumoto Y, Nakamura S, Morii E, Iida T, Matsumoto H. Whole-Genome Sequence of *Streptococcus tigurinus* Strain osk_001, Isolated from Postmortem Material. *Genome Announc*. 査読有 2017 Aug 31;5(35). pii: e00878-17. doi: 10.1128/genomeA.00878-17. PubMed PMID: 28860244; PubMed Central PMCID: PMC5578842.

Nabeya D, Kinjo T, Parrott GL, Uehara A, Motooka D, Nakamura S, Nahar S, Nakachi S, Nakamatsu M, Maeshiro S, Haranaga S, Tateyama M, Tomoyose T, Masuzaki H, Horii T, Fujita J. The clinical and phylogenetic investigation for a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus infection in an adult hemato-oncology unit. *J Med Virol*. 査読有 2017 Aug;89(8):1364-1372. doi: 10.1002/jmv.24800. Epub 2017 Mar 22. PubMed PMID: 28240370.

Bukowska-Oško I, Perlejewski K, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Kosińska J, Popiel M, Płoski R, Horban A, Lipowski D, Caraballo Cortés K, Pawełczyk A, Demkow U, Stepień A, Radkowski M, Laskus T. Sensitivity of Next-Generation Sequencing Metagenomic Analysis for Detection of RNA and DNA Viruses in Cerebrospinal Fluid: The Confounding Effect of Background Contamination. *Adv Exp Med Biol*. 査読有 2016 Jul 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27405447.

〔学会発表〕(計 1 件)

元岡大祐、腸内真菌叢解析法の構築と日本人の腸内真菌叢、日本医真菌学会、2017 年

〔図書〕(計 1 件)

元岡大祐、中村昇太、飯田哲也、堀井俊宏、羊土社、実験医学別冊 今すぐ始める！メタゲノム解析 実験プロトコール 2016 8

〔その他〕

ホームページ等

<http://imet.gen-info.osaka-u.ac.jp/en/imetdb.html>

<http://nkmr.biken.osaka-u.ac.jp/>

<http://ngs-service.biken.osaka-u.ac.jp>