

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06614

研究課題名(和文) 流入下水中ヒトウイルスの選択的メタゲノム解析による新規病原ウイルスの検出

研究課題名(英文) Exploring novel pathogenic enteric viruses from selective metagenomic analysis of domestic wastewater

研究代表者

風間 しのぶ (Kazama, Shinobu)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任講師

研究者番号：20749444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一本鎖(+)RNAウイルスを効率的に検出する選択的メタゲノム解析手法を用いて、流入下水およびヒト便検体から新たなウイルスゲノムと考えられる配列を検出することに成功した。当該配列は流入下水検体(31検体)から100%、および胃腸炎患者便検体(50検体)から86%の割合で検出された。本研究で用いた手法により、将来的なウイルス感染症の早期検出が期待され、また、本研究で検出した配列は新たな糞便汚染指標としても有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

途上国のみならず先進国においても、毎年ノロウイルス等の病原微生物による感染性胃腸炎が流行しており、我が国においてもその社会的損失は計り知れない。今後、社会の国際化や地球温暖化等による病原微生物の生態変化によって、新興ウイルスあるいは、これまで我が国では感染報告の無いウイルスによる新たな感染症の増加が懸念される。本研究では、新たなウイルスと考えられるゲノムの一部を下水から検出し、また地域における分布状況を示した。今後、本手法を応用することで、ウイルス感染症の発生状況を把握し、将来的なウイルス感染症の早期検出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using the selective metagenomic analysis method that efficiently detects single-stranded (+) RNA viruses, we succeeded in detecting a sequence considered to be an unknown viral genome in raw sewage and human stool samples. The sequence was detected in 100% of the raw sewage samples (31 samples) and 86% in the stool samples of gastroenteritis patients (50 samples). The method used in this study is expected to detect novel virus. It was also suggested that the sequence detected in this study is useful as a new indicator for fecal contamination.

研究分野：土木環境システム

キーワード：腸管系ウイルス メタゲノム 流入下水 未知塩基配列

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

途上国のみならず先進国においても、毎年ノロウイルス等の病原微生物による感染性胃腸炎が流行しており、我が国においてもその社会的損失は計り知れない。現在、国際ウイルス分類委員会には3,186種のウイルスが登録されているが、地球上の未発見ウイルスは、哺乳類に感染するウイルスだけでも32万種存在すると推定されている。今後、社会の国際化や地球温暖化等による病原微生物の生態変化によって、新興ウイルスあるいは、これまで我が国では感染報告の無いウイルスによる新たな感染症の増加が懸念される。人間社会におけるウイルス感染症の発生状況を把握し、将来的なウイルス感染症の早期検出することは感染症対策を講じる上で必要かつ急務である。2013年から2015年まで宮城県で実施した胃腸炎サーベイランスでは、胃腸炎患者から主に検出される8種のヒト腸管系ウイルス(ノロウイルスの遺伝子群Iおよび遺伝子群II: NoVGI および NoVGII, ロタウイルス: RoV, サポウイルス: SaV, アストロウイルス: AsV, アデノウイルス: AdV, パレコウイルス: PeV, およびエンテロウイルス: EV)をスクリーニングしているが、これらのウイルスがいずれも検出されない胃腸炎患者が全体の45%を占めた(連携研究者提供)。つまり、主要な胃腸炎ウイルス意外のウイルスによる感染症の発生を示唆している。

2. 研究の目的

これまで第2世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析にて下痢症便や下水からの新規ウイルス検出が試みられている^{2,3)}。しかし、ヒト便検体1つ1つから新規ウイルスの検出を試みることは効率が悪い。また、既存の報告で用いられた下水中ウイルスメタゲノム解析手法は全てのウイルスを対象としているため、ヒトウイルスが検出される確率は低い。

そこで本研究では、既知のヒト腸管系ウイルスの多くが一本鎖(+)RNAをゲノムとして有するウイルスであることから、同ゲノムを有するウイルスを効率的に検出する選択的メタゲノム解析手法を活用し^{4,5)}、下水検体からの新規ウイルス検出とその病原性の検討、および新規ウイルスによる感染症発生状況の把握を目的とする。

3. 研究の方法

下水検体からの新規ウイルス探索を目的に、宮城県仙台市にある浄化センターにて、2か月に1度の頻度で採水した流入下水検体に対して、選択的メタゲノム解析を行った(n=6)。得た配列のうち、遺伝子データベース上のいずれの遺伝子にも類似しない配列をアセンブリし、新規ウイルスゲノムの一部と考えられる未知の塩基配列を得た。なお、選択的メタゲノム解析による、一本鎖(+)RNAのゲノム検出効率を確認するために、全ウイルスゲノムを対象としたメタゲノム解析も実施した。さらに、得た配列にたいして、勝又ら(2015)の手法をもとに、未知塩基配列別にハイブリダイゼーション条件を検討し、全塩基配列の決定を試みた。

次に、新規ウイルスの分布状況を分析するために、同浄化センターにて、1か月に1度の頻度で採水した流入下水検体(n=31)に対して、リアルタイム定量PCR法を用いて、未知塩基配列を検出し、各検体中の分布状況を確認した。加えて、同下水集水域の小児科および内科医院(2医院)にてウイルス性感染性胃腸炎と診断された患者の直腸拭い液を1mLのPBSに懸濁させたものをヒト検体とし(n=50)、下水検体同様にリアルタイム定量PCR法を用いて、未知塩基配列の検出をおこなった。

なお、前述の下水およびヒト検体はいずれも2015年から2018年に採取した。

4. 研究成果

(1) 未知塩基配列の探索

本研究で用いた選択的メタゲノム解析をすることで、適用しない場合(全ウイルスゲノムを対象としたメタゲノム解析をした場合)に比べて、40-1,000倍の効率でヒトウイルス遺伝子を検出することに成功した。従って、選択的メタゲノム解析で得た全配列のなかで、遺伝子データベース上のいずれの遺伝子配列にも合致しない配列中においても、一本鎖(+)RNAをゲノムとして有するウイルス(ヒト腸管系ウイルスの多くが同ゲノムを有する)が相対的に多く存在すると考えられた。

下水検体の選択的メタゲノム解析(n=6)で得た配列の51-98%(95,000-817,000配列)が遺伝子データベース上のいずれの遺伝子にも類似しない配列であった。各試料から検出された遺伝子データベース上のいずれの遺伝子にも類似しない配列をアセンブリしたところ、4-27のコンティグ(DNA配列断片群を重ね合わせてできるコンセンサス配列やそれを構成する配列断片群)が生成され、それぞれの塩基長は103-2,049bpであった。全ての試料から得たこれらコンティグをさらにアセンブルしたところ、2-3試料に共通する7コンティグ(150-2,300塩基)を得た(Table 1)。生成された配列は遺伝子データベースのいずれの遺伝子にも類似していなかったことから(BLASTn検索)、新規ウイルスゲノムの一部である可能性が示唆された。

Table 1 下水検体から検出されたコンティグ

コンティグ	塩基長 [nt]	配列数	検出されたサンプル	BLASTn検索結果
A	1,251	1,158	Mar. / Nov.	該当なし
B	287	43	Sep.	
C	448	220	Jul. / Sep.	
D	1,329	1,948	Jan. / Mar.	
E	447	1,281	Jul.	
F	2,251	1,585	Jan. / Mar. / Jul	
G	151	5	Mar. / Nov.	

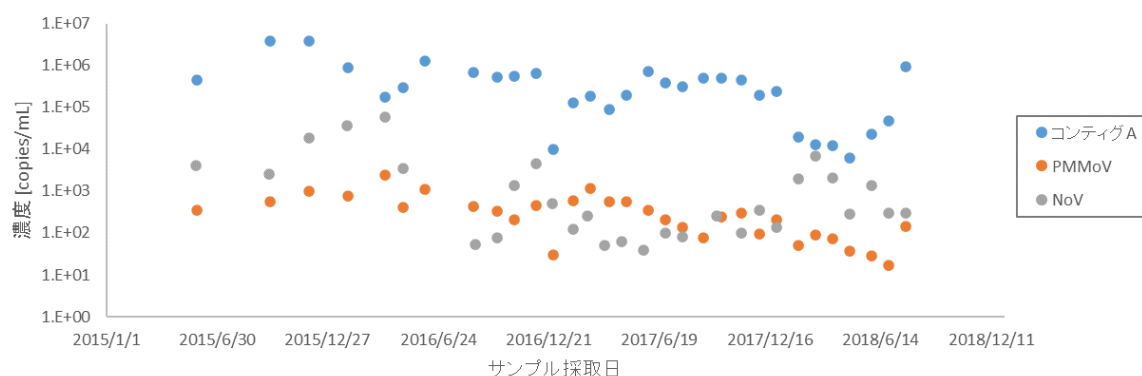


Fig.1 下水検体中のコンティグ E, PMMoV, および NoV 濃度

(2) 新規ウイルスゲノムの全塩基配列決定

(1) で得た7コンティグ (A-G) について、全塩基配列を得るため、コンティグに結合するプローブを設計し、ハイブリダイゼーション法⁵⁾にてそのウイルスゲノムを選択的に回収し、次世代シーケンサーにて対象ウイルスゲノムの全塩基配列を決定することを試みた。結果として、ハイブリダイゼーション法で回収されたゲノム濃度が低く (低回収率)、シーケンサーで配列を読むことができなかった。ウイルス RNA はそれ自身が高次構造を形成することが知られているが、この高次構造により対象ウイルスゲノムとプローブのハイブリダイゼーション効率が著しく低下することが懸念される。本研究では、RNA の高次構造を解消することを目的として、複数のプローブをもちいてハイブリダイゼーション効率を高めることを試みたが、プローブと対象配列の特異性や結合力 (Tm 値) を最適でなかったことが、回収率低下化をもたらしたと考えられた。したがって、プローブとコンティグ配列の結合のための条件である、プローブの特異性、結合時の温度、や時間の最適化し、回収率を上げることが課題である。

(3) 流入下水からの未知塩基配列検出

(1) で得たコンティグについて、プライマーおよびプローブ (検出系) を設計し、週一度の頻度で採水した流入下水サンプル (n=31) からの検出をこころみた。7コンティグ中1コンティグ (コンティグ E) について、特異的な検出系を確立することができた。他2コンティグについても検出系を設計したが、定量 PCR において、プライマーダイマーの生成が確認された。さらなる PCR サイクルの条件変更やプライマーの再設計により、検出系が確立できる可能性があるが、本課題内で確立はかなわなかった。

次に、その他胃腸炎ウイルスの流行状況との比較のためにノロウイルス (NoV)、および糞便汚染指標として検討されているトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) について、下水検体中濃度を測定したところ (n=31)、コンティグ E は 10^4 - 10^7 copies/mL (検出率: 100%)、NoV は 10^2 - 10^5 copies/mL (94%)、PMMoV は 10^1 - 10^3 copies/mL (100%) で検出された (Fig.1)。コンティグ E は全ての下水サンプルから検出され、また、PMMoV よりも高濃度で検出されたことから、新たな下水汚染指標として有用であることが示唆された。

また、コンティグ E と NoV の濃度変動パターンが逆相関する傾向がみられた。今後、ヒト検体中の正確な濃度を測定することで、胃腸炎ウイルス感染者はコンティグ E の保有量が少ないなどの関係性を明らかにすることが可能と考えられる。

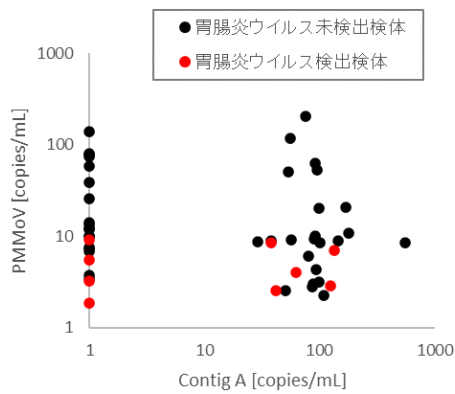


Fig.2 ヒト検体中コンティグ E と PMMoV 濃度。定量限界以下および検出限界以下の検体はその濃度を 1 copy/mL で示した

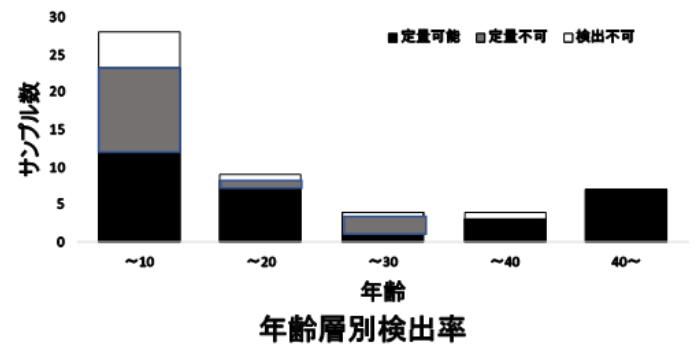


Fig.3 年齢別ヒト検体数とコンティグ E 検出数

(4) ヒト便検体からの未知塩基配列の検出

ヒト検体 (n=50) からコンティグ E および、PMMoV ゲノムの分析をしたところ、各ゲノムの検出率はそれぞれ、86%、100%であった。検出率としては PMMoV が高いが、両ゲノムが検出された検体間で比較すると、PMMoV よりコンティグ E が高濃度で検出される傾向がみられた (Fig.2)。なお、ヒト検体に関しては、拭い液量が検体間で異なると推測されるため、正確な濃度でないことに注意が必要であるが、異なるウイルスのゲノム量の比較を目的に濃度で示した。

年齢別の検体数が異なるものの、10歳未満の検体では定量限界以下および検出限界以下となる検体の割合が大きかった (Fig.3)。年齢と検出の関係については検体数を増やし、更なる検討が必要と考えられる。

また、本研究で用いた 50 ヒト検体うち、9 検体から胃腸炎ウイルス (ノロウイルス GI、ノロウイルス GII、ロタウイルス、ロタウイルスとアデノウイルスの共感染、サポウイルス) が検出されたが、同 9 検体から定量可能濃度で検出されたコンティグ E は 56% (5/9 検体) であり、全体のそれ (56%) と同程度、濃度の平均 (参考値) は $10^{1.8}$ copies/mL で全体のそれ ($10^{12.0}$ copies/mL) と同程度であった。性別による (男性: n=32、女性: n=18) 検出率や濃度 (参考値) も見られなかった。

当初の予定では、胃腸炎患者検体のみでなく、健常者からの検体も分析予定であったが、十分な検体が得られなかったため、両者の違いを解析することができず、病原性の検討にはいたらなかった。しかしながら、以上の結果から、コンティグ E は人に感染するウイルスのゲノムの一部である可能性が示唆され、また、(2) で示した下水中濃度と検出頻度から、糞便汚染指標としての有用性が示された。

参考文献

- 1) Anthony SJ et al., 2013, A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio*, 4(5): e00598-13. doi:10.1128/mBio.00598-13.
- 2) Castrignano et al, 2013, Two Novel Circovirus-Like Viruses Detected in Human Feces: Complete Genome Sequencing and Electron Microscopy Analysis, *Virus Res.*, 178(2):364-73. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.018.
- 3) Ng et al., 2012, High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage, *Jour. Virol.*, 86(22), pp. 12161–12175.
- 4) 風間ら, 2016, 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討. *土木学会論文集 G (環境)*, 71(7), III_339-III_349. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.024.
- 5) 勝又ら, 2015, ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウイルスゲノム回収手法の開発, *土木学会論文集 G (環境)*, 71(7), III_329-III_338. doi:10.2208/jscej.71.III_329.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 風間しのぶ、真砂佳史、森山一葉、大瀧雅寛
2. 発表標題 下水由来(+)ssRNAウイルスのメタゲノム解析を用いた未知胃腸炎ウイルスの探索
3. 学会等名 第5回環境水質工学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitoha Moriyama, Shinobu Kazama, Yoshifumi Masago, and Masahiro Otaki
2. 発表標題 Investigation of Unknown Genomes through Metagenomic Analysis of (+)ssRNA Viruses in Wastewater
3. 学会等名 the Water and Environment Technology Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山一葉，風間しのぶ，真砂佳史，大瀧雅寛
2. 発表標題 下水由来ss(+)RNAウイルスゲノム中の未知塩基配列の探索
3. 学会等名 第53回 水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間 しのぶ，真砂 佳史，三浦 尚之，今田 義光，井原 賢，田中 宏明，森山 一葉，大瀧 雅寛
2. 発表標題 下水由来ss (+) RNAウイルスメタゲノム中の未知塩基配列の探索
3. 学会等名 第20回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	当广 謙太郎 (Tohma Kentaro)		
連携研究者	斉藤 繭子 (Saito Mayuko) (20598031)	東北大学・医学(系)研究科・准教授 (11301)	