

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17935

研究課題名（和文）ポータブルDirect RNAシーケンスによる小児呼吸器感染症の迅速診断系の開発

研究課題名（英文）Development of rapid diagnostic tools for respiratory infections in children by using portable sequencer with direct RNA sequencing

研究代表者

今井 一男（Kazuo, Imai）

埼玉医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10816606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、安価なナノポア・シーケンサーであるFlongleを活用した小児及び成人の呼吸器ウイルスのメタゲノム診断技術の開発及び検証を目指し、実施した。呼吸器ウイルスに感染した患者から採取した臨床検体よりRNAを抽出・精製した後、2本鎖DNAを合成・増幅し、Flongleによるナノポア・シーケンスを行った。得られたデータをコンピューター解析することで、網羅的に呼吸器ウイルスを診断し、ウイルスゲノム解析が可能な方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、呼吸器ウイルスの診断とウイルスゲノム解析に活用できる検査法に留まらず、様々なウイルス感染症診断に展開できるウイルス同定技術へと発展できる可能性がある。この成果により、これまで診断が困難であったウイルス感染症を安価かつ簡便に同定することができ、診断および実際の治療に役立つ可能性があることに加え、病態に関連する可能性のあるウイルスゲノム解析を行えるツールとなり得ることに意義がある。併せて、新興感染症としてパンデミックを起こした新型コロナウイルス感染症の新たな診断法としても、国内の感染症対策に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a technology for detecting viruses which cause respiratory infections in children and adults by Flongle nanopore sequencer with metagenomics sequencing. Computer analysis of the obtained sequence reads allows to diagnosis with viruses in clinical specimens taken by the patients. The assembly analysis showed almost complete genome of viruses in clinical specimens. This study will contribute to provide the comprehensive diagnostic tools for detecting viruses in various clinical specimens by Flongle nanopore sequencer.

研究分野：感染症学

キーワード：次世代シーケンサー 呼吸器感染症 ウイルス メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

2015年の国連サミットで採択された「持続可能な開発のための2030アジェンダ」において、小児死亡率の改善は重要課題の1つとされる。特に、小児死亡原因の25~30%を占める呼吸器感染症への対策は緊急性の高い課題であるが、重症化を引き起こす要因として知られているウイルス感染症に対する対策の遅れが指摘されている。さらに、特定のウイルスに罹患することで、その後の呼吸器感染症のリスクが高まることが報告されており、正確な病原ウイルスの同定の必要性が高まっている。小児呼吸器感染症に関連するウイルスは多岐にわたり、新型コロナウイルス(COVID-19)など新興ウイルス感染症も関与する。次世代シーケンサー(Next generation sequencer; NGS)を利用したメタゲノム解析は、検体に含まれる遺伝子情報を網羅的に解析することで、ウイルス遺伝子を検出する技術であり、既知のウイルスのみならず、未知のウイルスの同定も可能とする。従って、発症早期の病原体診断に大きく寄与できると推定されるが、NGSを日常臨床に活用するには、ポータブル化・簡素化・迅速化ならびに検査コストの低減が必須である。新規NGSであるナノポアシーケンサーは、価格、運搬性、迅速性に優れたNGSであり、ナノポアシーケンサーの臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、廉価版ナノポアシーケンサーであるFlongle flow cellを用いた呼吸器ウイルスのメタゲノムシーケンスを行うことで、網羅的な小児呼吸器感染症の診断が可能なる「小児呼吸器ウイルスのPOCT検査」の確立を目指した。特に、これまでの2本鎖DNAをシーケンスする技術だけでなく、直接RNAをシーケンスするDirect RNAシーケンス法を用いた診断検討を試みた。従来のDNAシーケンスではサンプル準備のため、RNAを2本鎖DNAに変換するステップが必要であった。Direct RNAシーケンスは、上記のステップを必要としないため、従来のDNAシーケンスを用いた網羅的ウイルス検出法と比較し、診断法の簡素化・迅速化が可能であり、メタゲノム解析の臨床応用に直結させることが可能であると考えた。

3. 研究の方法

本研究ではインフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルスなど呼吸器症状を起こすウイルスに罹患した患者の臨床検体を収集し、メタゲノム解析を用いた呼吸器ウイルスの診断法について検討を行った。さらに本研究計画を作成した以後に新興感染症として新型コロナウイルス(COVID-19)のパンデミックが発生したため、COVID-19検体についても収集及び解析を行った。

1) FlongleによるDirect RNAシーケンス法の検証

ナノポアシーケンサーによるDirect RNAシーケンスは、MinION flow cellを用いた方法に最適されており、Flongle flow cellを用いた方法は報告されていなかった。従来の方法では、RNA鋳型量または最終産物に含まれる塩濃度が過量となり、Flongle flow cellに含まれるナノポアたんぱく質が機能不全になる事が判明した。そのため、Input RNA量やバッファー濃度などを最適化することで、Flongle flow cellを用いたDirect RNAシーケ

ンス要領を決定した。

2) Flongle flow cell と SISPA 法を組み合わせた DNA シーケンス法の検証

Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) 法は特異配列を付加したランダムプライマーを用いて RNA を逆転写し、特異配列を標的とした **tailed-PCR** 法を用いて逆転写した鋳型を増幅する方法で、これまでメタゲノム解析に搬送されてきた方法である。**Flongle flow cell** に合わせて DNA 鋳型量を最適化し、**Flongle flow cell** と **SISPA** 法を組み合わせた DNA シーケンス要領を確立した。

3) 呼吸器ウイルス解析に必要なパイプラインの構築

臨床検体を用いた **Flongle flow cell** ナノポア・シーケンスの結果、出力されるシーケンスリードデータの解析方法について検証を行い、マッピング解析によりウイルス同定を行う解析パイプラインについて検証した。主に、**Oxford Nanopore** 社が提供するクラウドベース解析ソフトである、**WIMP** を用いて解析を実施した。

4. 研究成果

当初、**Flongle flow cell** による **Direct RNA** シーケンスを用いた呼吸器ウイルスのメタゲノム診断について検証を行った。しかしながら、臨床検体から抽出される RNA 量が十分量確保できず、**Flongle flow cell** より出力されるリードが予想よりも少量であったため、十分な解析データを収集することが困難であった。そのため、当初の計画通り、**Flongle flow cell** と従来法である **SISPA** 法を組み合わせた呼吸器ウイルスのメタゲノム診断法について検証を実施した。

Flongle flow cell と **SISPA** 法を組み合わせた呼吸器ウイルスのメタゲノム診断法についての検証として、**COVID-19** (8 検体)、ウイルス (2 検体)、**RS** ウイルス (2 検体)、計 12 検体の臨床検体を用いた・感染ウイルスの確定は **PCR** 法 (新型コロナウイルス) および迅速抗原検査 (インフルエンザウイルス及び **RS** ウイルス) で実施した。

Flongle flow cell より得られたリードの中央値は **58,500** リードであり、全ての検体において解析に十分なリード量を得ることができた。全ての検体において、目的ウイルス由来のリードを検出した (中央値: **500** リード)。その他にヒトに病原性を持つウイルスリードは検出されず、マッピングソフトである **WIMP** を用いた解析により呼吸器ウイルス病原体を検出することが可能であった。併せて、**assembly** 解析を実施し、目的のウイルスゲノムの解析を試みた。その結果、目的ウイルスのリード数が全体に占める割合の高い臨床検体において、**93.1-99.8%**の目的ウイルスゲノムをカバーした **contig** を確認できた。本研究の成果により、**Flongle flow cell** を使用した呼吸器ウイルス感染症のメタゲノム診断が可能であることを確認した。これらの成果は、国内の学術集会において報告した。

本研究計画の当初の目的は、**Flongle flow cell** と **Direct RNA** シーケンスを用いて、呼吸器ウイルス感染症のメタゲノム診断を可能とする技術の確立であった。**Flongle flow cell** を用いた **Direct RNA** シーケンスの基礎的な方法は構築できたが、検体から抽出可能な RNA 量が十分ではなく、**Flongle flow cell** と **SISPA** 法を組み合わせたメタゲノム診断法について検証した。今後 RNA が十分得られる血流感染症などに活用し、検証を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井一男
2. 発表標題 ポータブルシーケンサーFlongleを用いた呼吸器ウイルス感染症の診断法に関する研究
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会 第69回日本化学療法学会総会 合同学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------