様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　７ 月 ２８ 日現在

機関番号：８２５０５
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｈ０６４０６・１９Ｋ２１４８５

研究課題名（和文）次世代シークエンサーを用いたヒト常在ウイルス叢による個人識別法の開発

研究課題名（英文）Development of forensic human identification method baced on virome by next generation sequencing

研究代表者
岸本　麻衣（Kishimto, Mai）

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号：２０８２２０６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、網羅的なヒト常在ウイルス叢解析による個人識別法の開発を目的とし、健常被験者から採取した計４８検体の皮膚スワブについて、ウイルス叢解析を実施した。その結果、合計78科247属のウイルスが検出された。特にPapilomaviridae、Herpesviridae等のヒト皮膚組織に感染しうるウイルス科由来のリードは、全検体から多様な属のバリエーションで検出された。また、一本鎖DNAウイルスである、Anelloviridae、Parvoviridaeも９０％以上のサンプルから検出された。今後このような、ユニバーサルに検出されるウイルス科に着目し、精度の高い個人識別を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、次世代シークエンサーを用いた細菌・ウイルスを含む網羅的なヒト常在微生物叢解析による個人識別法に関する基礎的検討を行うものである。このような網羅的な常在微生物叢のメタゲノム解析による個人識別により、現在のDNA型鑑定に十分な質・量のヒトDNAが得られない資料の個人識別に役立つ可能性がある。これまでヒト皮膚常在ウイルス叢研究は、二本鎖DNAウイルスのみを対象としたものに限られていたが、今回初めてDNAおよびRNAウイルスを包括したヒト皮膚常在ウイルス叢を明らかにした。その結果、多くのヒト皮膚検体から安定して検出されるウイルス種が明らかになり、個人識別の指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Forensic science is application for the purpose of criminal investigation and evidence production in court. Here, we investigated human skin virome, including both DNA and RNA viruses to explore the possibility of individual identification. Total 48 samples corrected from four subjects at four body sites over a week and a month were analyzed. In result, 0.85% reads obtained were estimated to be derived from viruses including 78 families, 274 genus. Reads of human infectious papillomaviruses, herpesviruses and other viruses were detected from all samples with high diversity of genera. In conclusion, comprehensive human skin virome were revealed in this study, however, individual identification could not achieved only from skin virome analysis using NGS. Deep-sequencing of PCR amplicon derived from universal primer targeting Papillomaviridae and Herpesviridae, which were human infectious and constantly detected, is thought to be nececcery for individual identification.

研究分野：法科学

キーワード：皮膚常在ウイルス叢　個人識別　メタゲノム解析　次世代シークエンサー

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

## １．研究開始当初の背景

近年、次世代シークエンサー（NGS）等の大規模遺伝子配列解析技術の発達によってメタゲノム細菌叢解析が盛んに行われており、法医学分野でも、個人識別や死後経過時間の推定、地理情報推定等に応用が期待されているという学術的背景がある（Schmedes et al., J. Clin. Microbiol., 2016)。それらの検討の中では、①細菌が共通で保有する16SrRNA遺伝子のPCR増幅産物を次世代シークエンサーで解読する16Sメタゲノム法、または②サンプル中に含まれる遺伝子を網羅的に次世代シークエンサーで解読するWhole genome shotgun sequence法が用いられている。しかし、①16Sメタゲノム法については、16SrRNA遺伝子が配列の多様性に乏しく種レベルの配列の同定が困難であるため、個人識別に十分な情報量が得られないという問題点が指摘されている。②Whole genome shotgun sequence法では、細菌の全ゲノムを解析対象とするためリードカバレッジの不足やデータ解析の複雑化といった問題点が指摘されている（Clarke et al., Forensic. Sci. Int., 2017)。

## ２．研究の目的

これらの課題を解決するため、本研究では常在ウイルスに着目し、次世代シークエンサーを用いたヒト皮膚常在ウイルス叢による個人識別法を開発することを目的とする。細菌よりも遺伝子変異速度が早く、配列多様性が大きいウイルスのゲノムを解析対象にすることにより、細菌叢のみを解析するよりも精度の高い個人識別を行える可能性がある。また、ウイルスは細菌よりも遺伝子長が短いため、ゲノム全長に対し十分なリードカバレッジが得られるとともにデータ解析も容易になる可能性がある。

ヒト常在細菌叢による個人識別法に関する検討は多数行われているが、常在ウイルス叢のメタゲノム解析による個人識別の試みは本研究が初めてである。本研究ではヒト皮膚を主な対象として研究を行うが、DNA・RNA ウイルスを含めた網羅的なヒト皮膚常在ウイルス叢の調査は本研究が初めてである。本研究成果は、現行のDNA型鑑定法であるSTR型やミトコンドリアDNA型検査に十分な質・量のヒトDNAが得られない資料（タッチサンプル、毛髪等）の個人識別に応用できる可能性がある。

## ３．研究の方法

ヒト皮膚スワブを対象として、次世代シークエンサーを用いた網羅的なヒト常在ウイルス叢解析を実施し、同一被験者に由来する試料か否かを正確に識別可能な解析手法を検討する。

### (1) 皮膚ウイルス叢解析法の最適化

ヒト皮膚スワブから NGS によりウイルスのメタゲノム解析を実施する場合、サンプルに含まれるウイルス由来配列の絶対量が非常に少ないため、個人識別に足るデータ量を得ることが一番の課題となる。そこで、サンプル採取～ライブラリー調製において、ヒトゲノムや細菌ゲノム等のバックグラウンドを低減させつつウイルスゲノムの回収効率を向上するための処理方法について検討を実施した。

### (2) ヒト皮膚ウイルス叢解析

４名の健常被験者の体の部位４ヶ所（両手のひら、両上腕内側、両頬、両耳介後背部）より、3回（1回目の採取から、1週間後および1ヶ月後）にわたり採取した計４８検体の皮膚スワブについて、検討したワークフロー（図1）に基づき、次世代シークエンサー解析を実施した。これらの試料の解析により、検出ウイルスの皮膚の部位による変化や経時的な変化を明らかにすることで、ウイルス叢による個人識別の有用性に関する基礎的検討を目指す。

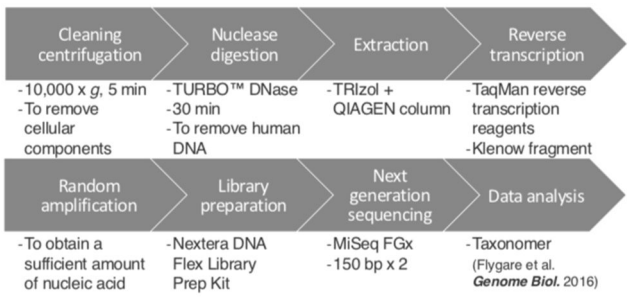


図１ ワークフロー

得られたリードは、CLC Genomic Workbenchソフトウェアによりクオリティトリミングを実施し、Taxonomer（Flygare et al., Genome Biol., 2016)にて、まずリードの大まかな由来（ヒト、細菌、真菌、ウイルス、その他）を特定し、ウイルスと分類されたリードについては科および属を特定した。得られたウイルス科および属とそのリード数に基づき、各種クラスタリング手法により個人識別可能な方法を試みた。

## ４．研究成果

### (1) 皮膚ウイルス叢解析法の最適化

TUViD-VM 法(Kohl and Kurth. Emerg. Infect. Dis. 2015)を元に各処理ステップの条件を検討した。TUViD-VM 法とは、組織などの宿主・細菌等由来の核酸が多く含まれるサンプルから、微量の DNA/RNA ウイルス核酸を NGS で検出するために検討されたワークフローである。具体的には、核酸抽出前の①フィルター濾過によるヒト・細菌由来細胞の除去、②核酸抽出前の DNase、RNase 処理による Cell-free 核酸の除去、③核酸抽出キット、④DNA・RNA 個別抽出または同時抽出、⑤ライブラリー調整前のランダム増幅の有無の各条件で調整したライブラリーを NGS で解析し、ヒト・細菌・ウイルス由来リードの比率により各手法を評価した。その結果、①フィルター濾過、③核酸抽出キットおよび④DNA・RNA 個別抽出または同時抽出については、ほとんどヒト・細菌由来リードの低減に効果が見られなかったが、②DNase、RNase 処理を実施したサンプルでヒト由来リードの大幅な減少が見られた。また、⑤ランダム増幅を実施したサンプルでは、ファージ由来のリードの大幅な増幅が確認された。そのため、サンプル採取→DNase 処理→ランダム増幅→ライブラリー調製→NGS 解析のワークフローに基づいて、以降の被験者から採取したサンプルの解析を実施した。

（2）ヒト皮膚ウイルス叢解析

① 得られた全リードの由来

採取した計４８検体の皮膚スワブについて、検討したワークフローに基づき、次世代シークエンサー解析を実施し Taxonomer にて分類した（図１）。その結果、ウイルス由来のリードは得られたリード全体の 0.85%を占めており、全てのボルチモア分類のウイルスリードが検出された。このことから、検討したワークフローにより、ウイルス核酸の種類によらず、包括的なヒト皮膚ウイルス叢が検出可能であることが示唆された。しかし、分類不能なリードが全体の 75%以上を占めているため、さらにワークフローの改善の余地はあると考えられる。

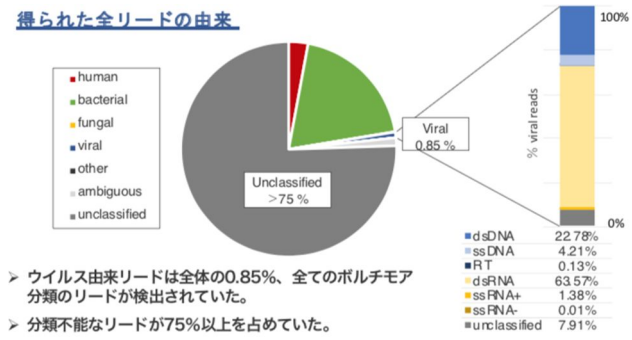


図２ 得られた全リードの由来

② リードの分類

各サンプルから平均 22 属、合計 78 科 247 属のウイルスが検出された（図２）。特に Papilomaviridae、Herpesviridae 等のヒト皮膚組織に感染しうるウイルス科由来のリードは、全検体から多様な属のバリエーションで検出された。また、一本鎖 DNA ウイルスである、Anelloviridae、Parvoviridae も 90%以上のサンプルから検出された。これまで、ヒト皮膚常在ウイルス叢の研究は二本鎖 DNA ウイルスを対象としたものに限られていたが、本研究の成果として、DNA/RNA ウイルスを 包括したヒト常在ウイルス叢が明らかになった。ただし、昆虫、植物、真菌等の脊椎動物以外を宿主とするウイルスに由来するリードも数多く検出されており、結果の解釈には注意を必要とする。

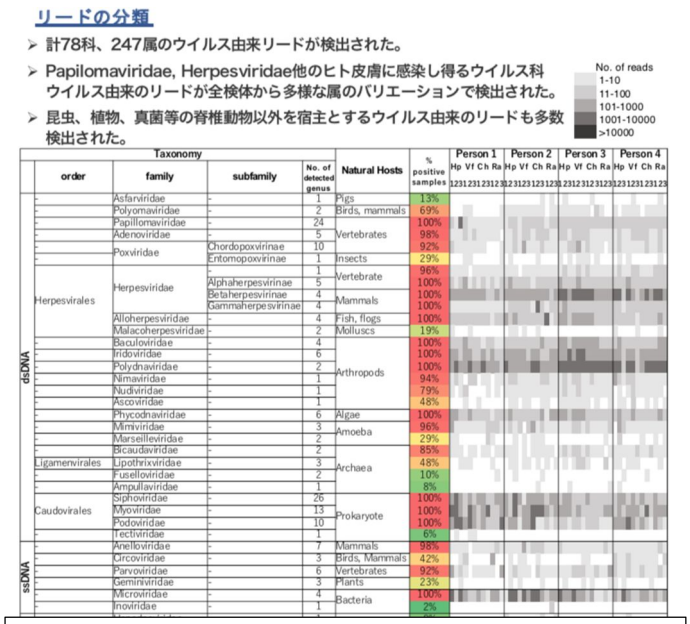


図３ リードの分類（一部抜粋）

（3）個人識別法の検討

個人識別のための試みとして、検出されたウイルス属とそのリード数から階層的クラスタリング解析および主成分分析を実施したところ、検出されたウイルスの分類およびリード数と個人の間に相関はなく、個人識別を達成することは困難であった。そのため現在は、因子分析法により、個人差に強く関与しているウイルス属を抽出し、解析を進めている。さらに今後は、全ての検体から安定して検出されているウイルス科である Papilomaviridae、Herpesviridae に着目して、ユニバーサルプライマーによる増副産物を次世代シークエンサーで解析することで、個人間のウイルスゲノム核酸の配列多様性をもとに個人識別を試みる。

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<br>岸本麻衣、武藤淳二、藤浪良仁、中原弘明、 佐々木道仁、大場靖子、澤洋文 |
| ２．発表標題<br>ヒト皮膚常在ウイルス叢による個人識別法の検討 |
| ３．学会等名<br>新学術領域「ネオウイルス学」第7回領域班会議 |
| ４．発表年<br>2019年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|