

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20635

研究課題名（和文）環境RNA解析による時間的感度を考慮した都市衛生動物の高感度検出・定量法の開発

研究課題名（英文）Development of temporally sensitive detection method for vectors of infectious diseases based on environmental RNA

研究代表者

清 和成（Sei, Kazunari）

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80324177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、衛生動物が媒介する感染症が世界中で問題となっている。感染症を媒介する衛生動物は、一般的に比較的人目につかない場所に棲息しており、目視や捕獲等の従来法によるモニタリングには多大な労力を要することになるため、環境DNA（eDNA）およびeRNAに着目した衛生動物モニタリング手法の開発を目指して一連の研究を実施した。

eDNAおよびeRNAの濃縮精製条件を比較検討し、好適条件を明らかにして衛生動物のモニタリング手法として確立した上で、住血吸虫の中間宿主目を対象とした検出の時間的感度評価を実施した結果、eRNAによって衛生動物の存否を時間的に高感度で判別できる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境RNA（eRNA）を衛生動物のモニタリングに用いようとする研究は世界中を見渡してもほとんどなく、本研究で得られた成果は、eRNAがこの目的に対して、検出の時間的な感度としての優位性をもつ優れた指標となりうることを示した点で学術的価値が高いものと考えている。社会的な意義としては、従来多大な労力を求められてきた衛生動物のモニタリングに簡便な手法を提案することができたことから、各種の感染症を未然に防ぐ上で基本となる衛生動物の存否や生息状況の評価するための新たなツールの提供を通して、感染症の観点から人の安心・安全な生活環境の構築に向けて貢献できる成果が得られたものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, infectious diseases transmitted by vectors have become a worldwide problem, and cases have been reported in Japan as well. Since the vectors of infectious diseases are found in relatively unnoticed areas, monitoring them by conventional methods such as visual observation or capture requires a great deal of labor. The purpose of this research was to develop a method for monitoring vectors of infectious diseases applying environmental DNA (eDNA) and eRNA analysis, especially focusing on the temporal sensitivity of detection.

We compared eDNA and eRNA enrichment and purification conditions using filters, clarified optimal conditions, and established a monitoring method. The results of the laboratory scale vectors detection experiment showed that eRNA has the potential to quantitatively detect the presence or absence of hygienic animals with high temporal sensitivity.

研究分野：環境衛生学

キーワード：環境RNA 環境DNA 衛生動物 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

2004年9月にアメリカ・ロックフェラー大学で開催された『人間、家畜と野生動物間の感染症伝播の現状と可能性に関するシンポジウム』で提唱された『OneWorld, One Health』という考え方(マンハッタン原則)では、エボラ出血熱、重症急性呼吸器症候群(SARS)、鳥インフルエンザなどの、近年度々問題となってきた各種の感染症の発生には、人間の公衆衛生と動物衛生が密接に関係しており、人間の健康・衛生管理のために、家畜や野生生物、生態系も含めた総合的な衛生管理の必要性が示されたり。特に上述のような人獣共通感染症の流行は、開発や人口増加に伴う野生動物と人間との接触機会の拡大、発達した交通網による感染者や感染動物の移動など、環境の変化やグローバリゼーションによる部分も大きいことから、人間および動物の間で流行する感染症を予防するための包括的取組みが求められる。

近年、日本国内でも、衛生動物が媒介する新たな感染症の症例が報告されるようになってきた。2013年以降、西日本を中心として、死者も報告されるなど定着、拡大、深刻化しつつあるマダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群(SFTS)や日本紅斑熱、2014年に東京都内を中心としてヒトスジシマ蚊が媒介したデング熱などは記憶に新しい。人の生活圏(都市生態系)において、これらの感染症を媒介する衛生動物をモニタリングし、適切な都市の衛生管理につなげることは、衛生学的観点からの安全・安心な社会構築の一助になるものと考えている。ところが、一般に衛生動物は、都市生態系において、比較的人目につかない場所に営巣、棲息しており、目視や捕獲調査などの従来法によるモニタリングは、多大な労力を要することとなる。上述の都内におけるデング熱発生の際には、保健所職員等による、捕虫網を用いたヒトスジシマ蚊捕獲の様子がメディア報道され、その労苦は一般市民にも広く知れ渡ることとなった。このような背景から、研究代表者らは、近年水圏生態学の分野で脚光を浴びている環境DNAを人の衛生や都市衛生管理に適用するべく、国内外で衛生動物の生息分布や個体数推定手法の確立を目指した研究を実施してきた。

ここで、環境DNAとは、環境中に棲息している/していた生物が放出したDNAのことであり、大気、水、土壌などの自然環境中には普遍的に存在している。現状では、水圏生態系を中心として、水生生物の多様性調査や希少種の探索、特定個体種の生物量推定など、主として純粋な生態学調査に用いられており、調査対象となる水環境からわずかに数リットル程度を採水し、この中に存在するDNAを抽出・精製、解析することで、対象となる水環境中に存在する生物を特定できる<sup>2)</sup>。2018年5月には、ニュージーランド・オタゴ大学の遺伝学者Neil Gemmell教授が率いる国際研究チームが、スコットランドのネス湖で湖水中の環境DNAを解析し、伝説の生物である「ネッシー」の存否を明らかにするプロジェクトに着手したことで、一般にも広く知られるようになった。一方、DNAは水環境中に放出された後、数週間~数ヶ月にわたって残存し続けることができることから、環境中での寿命は比較的長いといえる。これはすなわち、標的生物由来の環境DNAの検出が、当該生物が今まさに存在していることを必ずしも保証しないことを意味しており、環境DNAを用いた手法には、時間的感度に問題があると考えられた。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では、DNAに比して寿命の短いRNAに着目し、国内で症例が見つかっている、あるいは温暖化などの進行に伴って今後国内で症例の報告や数の増加の可能性があるとされる各種感染症を念頭において、都市生態系における水試料(都市河川や公園等の池など)中の環境RNA分析によって各種感染症を媒介する衛生動物を監視する手法の開発を目的とした。3年の研究期間内の達成目標としては、①都市生態系水試料中の環境RNA濃縮・回収手法の確立、②標的衛生動物由来環境RNAの特異的高感度検出・定量法の確立、③標的衛生動物由来環境RNAの特異的高感度検出・定量法の時間的感度評価であり、これらを達成することにより、環境RNA解析による時間的感度を考慮した都市衛生動物の高感度検出・定量法を確立することを掲げて研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 都市生態系水試料中の環境RNA濃縮・回収手法の確立

モデル衛生動物として、本学医学部寄生虫学・熱帯医学講座で継代飼育されていた住血吸虫症を媒介する中間宿主貝 *Biomphalaria glabrata* の分与を受け、実験に用いた。40Lの自然河川水を入れた60L容の水槽に10~15個体の *B. glabrata* を飼育し、飼育水の採水を行った。採水後の試料水を吸引圧20kPaで吸引ろ過に供して、ろ紙上にRNAを捕捉した。このろ紙からRNeasy PowerWater Kit (Qiagen)を用いた自動核酸精製装置QIAcube (Qiagen)で100μLのRNA抽出液を得た。なお、手法の確立に際して、ろ過水量(100mL、300mL、1,000mL)、ろ紙素材(酢酸セルロース(CA)製、ポリカーボネート(PC)製、およびガラス繊維(GF)製)、ろ紙孔径(0.2μm、0.45μm、0.8μm(ただし、GF製は0.7μm))について、回収された環境RNAの濃度と質を比較検討した。環境RNA濃度はNanoDrop (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定し、環境RNAの質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)によって得られるRIN値の測定結果、ならびに *B. glabrata* に特異的なプライマーを用いた逆転写PCRの増幅結果に基づいて判定した。

(2) 標的衛生動物由来環境 RNA の特異的高感度検出・定量法の確立

PCR 法をベースとした検出法の中でも最も高感度な検出が期待できる Droplet Digital PCR (ddPCR) 法によって、回収された *B. glabrata* 由来の環境 RNA を定量し、検出下限濃度 (log copies/L) を評価した。ddPCR は、回収された環境 RNA を逆転写反応に供したのち、ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad) を使用した反応液と 96 穴マイクロプレート上で混合し、ドロップレットを作製、PCR 後にドロップレットの蛍光測定により行った。

(3) 標的衛生動物由来環境 RNA の特異的高感度検出・定量法の時間的感度評価

4L 容の 3 つの水槽をジャッキで高さをつけて連結し、河川の上流、中流、および下流を模した流水実験系を作成した (図 1)。この流水実験系に、相模川 (神奈川県) の河川水と水道水を 1 対 4 の割合で混合した模擬河川水を、流速が  $3.4 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{sec}$  となるようポンプで供給した。中流水槽で 3 個体の *B. glabrata* を 1 週間飼育の後、除去し、*B. glabrata* の除去前後において上流水槽、中流水槽、下流水槽からそれぞれ水槽試料水を採取して、環境 DNA および環境 RNA を回収し、PCR および逆転写 PCR によって *B. glabrata* 由来の環境 DNA および環境 RNA の検出を確認した。試料水の採水は図 2 に示したスケジュールで実施し、水槽内の水が均一に混ざるよう、よく攪拌しながら行った。なお、分析は全て 3 連で行った。

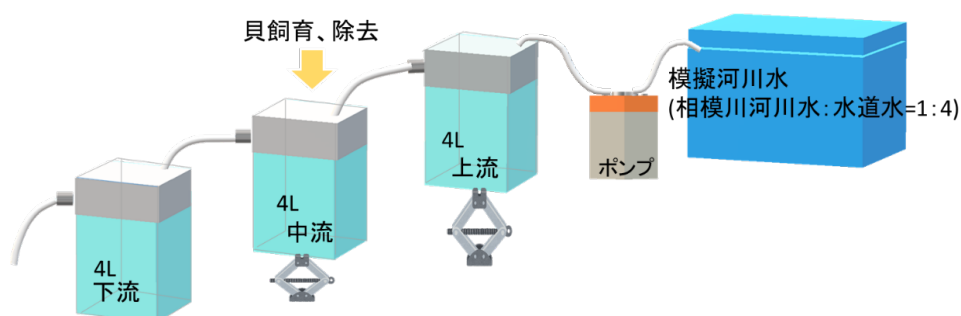


図 1 流水実験系の概要

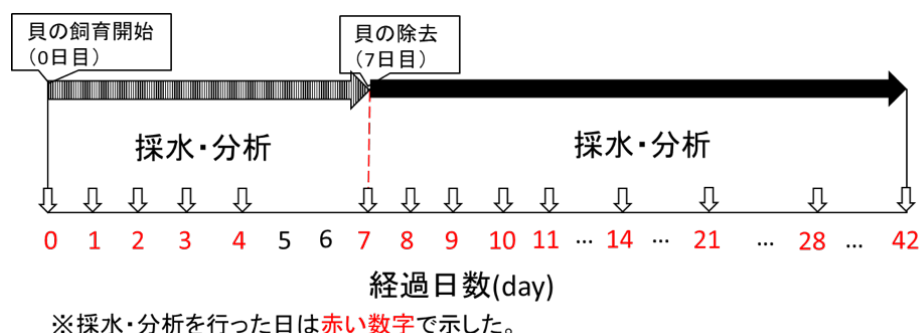


図 2 実験系からの採水スケジュール

4. 研究成果

(1) 都市生態系水試料中の環境 RNA 濃縮・回収手法の確立

各ろ紙材で回収された環境 RNA 濃度を図 3 に示す。CA 製および PC 製のろ紙で、回収された環境 RNA 濃度が有意に高くなり、ろ過水量が多いほど回収された環境 RNA 濃度は増加したが、ろ過の際に目詰まりが生じ、全量ろ過するために長時間を要した。

一方、ろ紙の種類およびろ過水量の変化させた各ろ過条件における RIN 値の平均は、CA 製はろ過水量 100 mL で  $5.9 \pm 0.94$ 、300 mL で  $5.1 \pm 0.43$ 、1000 mL で  $4.8 \pm 0.41$ 、PC 製はろ過水量 100 mL で  $6.6 \pm 0.45$ 、300 mL で  $4.6 \pm 0.12$ 、1000 mL で  $5.2 \pm 0.21$ 、GF 製はろ過水量 100 mL で

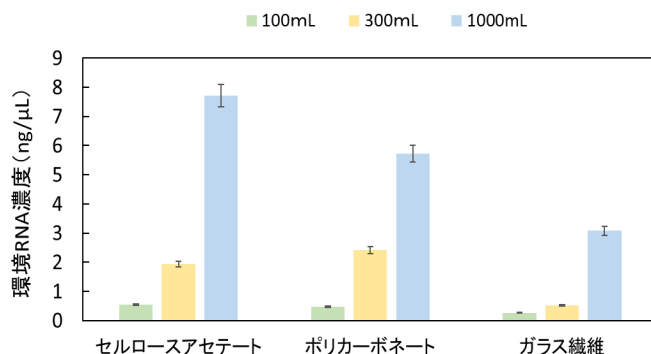


図 3 ろ紙の種類およびろ過水量と回収された環境 RNA 濃度

6.4±0.65、300 mLで4.7±0.14、1000 mLで4.7±0.24であり、ろ過水量が少ないほどRIN値が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。これらの結果を踏まえ、ろ紙素材として最も安価なCA製を選定し、さらに好適ろ紙孔径について検討した。結果を図4に示す。ろ紙孔径0.2 μm～0.8 μmの間では、回収された環境RNA濃度、RIN値ともに有意差はなく、ろ紙孔径による環境RNA回収量、およびそのRNAの質には影響がないものと考えられる。

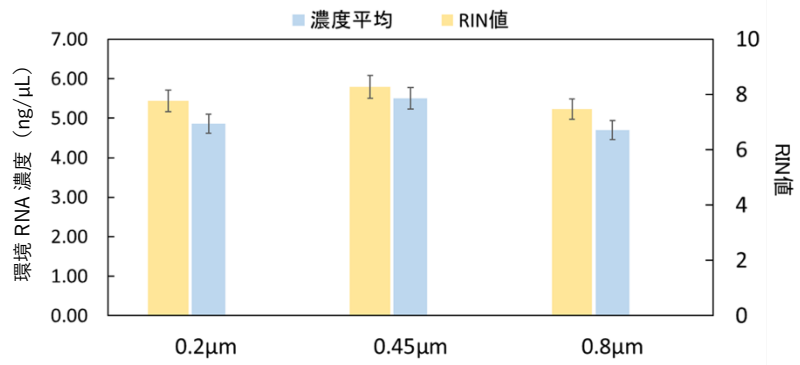


図4 CA製ろ紙の孔径と回収された環境RNA濃度

したがって、ろ過操作のしやすさの観点から、好適ろ紙孔径は0.8 μmとした。なお、回収された環境RNAに対して、*B. glabrata*に特異的なプライマーを用いた逆転写PCRを行った結果、ろ過水量100 mLで回収された環境RNAからも検出できることが示されたことから、環境RNA濃縮・回収手法のプロトタイプとして、孔径0.8 μmのCA製のろ紙を用い、ろ過水量100 mL、吸引圧を20 kPaとした吸引ろ過によってろ紙上に捕捉する手法を確立した。また、DNAとRNAで本質的に相違がないと考えられるため、環境DNAの好適濃縮・回収手法も同手法とした。

(2) 標的衛生動物由来環境RNAの特異的高感度検出・定量法の確立

逆転写 ddPCR による *B. glabrata* 由来の環境RNAの定量の結果、通常の逆転写PCRでは検出が困難であった 1.47 log copies/L (≒29.5 copies/L ≒ 0.03 copies/mL) もの微量の標的RNAを高感度で検出・定量が可能であることを確認した。これは、標的となる衛生動物が存在していれば、逆転写 ddPCR 法によってほぼ確実に検出・定量が可能であることを示しており、逆転写 ddPCR 法を用いることで、本研究で求める標的衛生動物由来環境RNAの特異的高感度な検出・定量が達成できるものと考えられた。

(3) 標的衛生動物由来環境RNAの特異的高感度検出・定量法の時間的感度評価

図5(A)～(C)に、それぞれ上流水槽、中流水槽、下流水槽における環境DNAおよび環境RNA濃度の推移を示す。上流水槽では、環境DNAおよび環境RNAはほとんどなかったが、*B. glabrata*を飼育した中流水槽では、環境DNAおよび環境RNA濃度は*B. glabrata*飼育開始から飼育7日後をピークとして増加、*B. glabrata*除去後は減少傾向を示し、環境DNAおよび環境RNA濃度が*B. glabrata*の存否を反映したのと考えられる。また、下流水槽では*B. glabrata*飼育開始後に環境DNAおよび環境RNA濃度は若干増加し、*B. glabrata*除去後は減少したが、全体的には大きな濃度変化は見られなかった。中流水槽で飼育した*B. glabrata*由来の環境DNAおよび環境

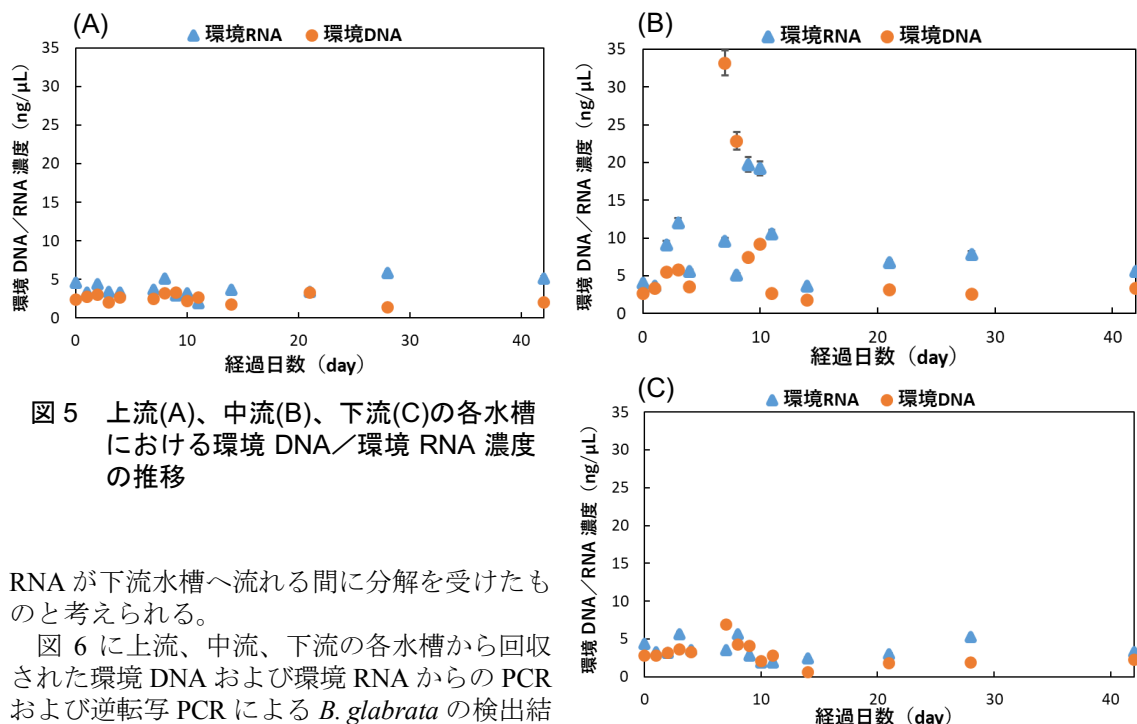


図5 上流(A)、中流(B)、下流(C)の各水槽における環境DNA/環境RNA濃度の推移

RNAが下流水槽へ流れる間に分解を受けたものと考えられる。

図6に上流、中流、下流の各水槽から回収された環境DNAおよび環境RNAからのPCRおよび逆転写PCRによる*B. glabrata*の検出結

果を示す。上流水槽では、*B. glabrata* 由来の環境 DNA および環境 RNA は実験期間を通して非検出であった。中流水槽では、*B. glabrata* 飼育開始 1 日後から *B. glabrata* 由来の環境 DNA、2 日後から *B. glabrata* 由来の環境 RNA が検出された。また、*B. glabrata* の除去 2 日後には *B. glabrata* 由来の環境 RNA が非検出となったのに対して、*B. glabrata* 由来の環境 DNA は除去 21 日後まで検出され続けた。下流水槽では、*B. glabrata* 飼育開始 1 日後から除去後以降も *B. glabrata* 由来の環境 DNA のみ検出され続けたが、*B. glabrata* 由来の環境 RNA は 1 度も検出されなかった。環境 DNA 解析では、*B. glabrata* を飼育していた中流水槽だけでなく下流水槽でも検出されたことから、時間が経つにつれ、中流水槽から下流水槽へと移流、残存したものと考えられる。すなわち、環境 DNA 解析により *B. glabrata* を飼育していない下流水槽でも検出されたことから、実際に衛生動物が棲息していない場所での検出の可能性があるといえる。また、*B. glabrata* の除去後は *B. glabrata* 由来の環境 RNA が環境 DNA よりも早く非検出となったことから、環境 DNA に比べて環境 RNA は時空間的な検出感度が高いと考えられた。

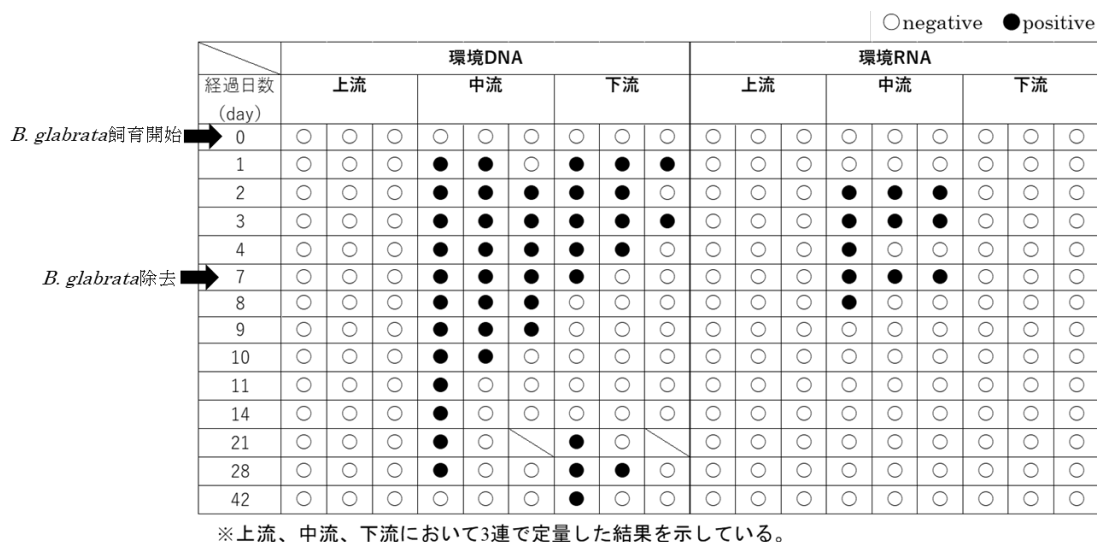


図 6 流水実験系における PCR および逆転写 PCR による *B. glabrata* 由来の環境 DNA/環境 RNA の検出結果

(4) まとめ

本研究は、各種感染症を人に媒介する衛生動物を、環境 RNA 解析により簡便にモニタリングするための手法の開発を目的として、マンソン住血吸虫の中間宿主貝である *B. glabrata* をモデル衛生動物として用い、環境 DNA および環境 RNA の最適な濃縮・回収手法を確立するとともに、環境 DNA および環境 RNA 解析による標的衛生動物の高感度検出・定量法としての有用性を、検出の時間的感度の面から評価した。その結果、以下 3 点を結論として得た。

- ① 環境 DNA および環境 RNA の濃縮・回収手法のプロトタイプとして、孔径 0.8 μm の CA 製のろ紙を用い、ろ過水量 100 mL、吸引圧を 20 kPa とした吸引ろ過によってろ紙上に捕捉する手法を確立した。
- ② PCR 法をベースとした検出法の中でも最も高感度な検出が期待できる Droplet Digital PCR (ddPCR) 法によって、回収された *B. glabrata* 由来の環境 RNA を定量し、通常逆転写 PCR では検出が困難であった 1.47 log copies/L (≒29.5 copies/L ≒ 0.03 copies/mL) もの微量の標的 RNA を高感度で検出・定量が可能であることを確認した。
- ③ 流水実験系を作成して *B. glabrata* 由来環境 RNA の特異的高感度検出・定量法の時間的感度を評価し、環境 RNA 解析によって時空間的に高感度の検出・定量が可能であることを示した。

<引用文献>

- 1) [http://www.oneworldonehealth.org/sept2004/owoh\\_sept04.html](http://www.oneworldonehealth.org/sept2004/owoh_sept04.html)
- 2) Darling, J. A. and Mahon, A. R. (2011) Environmental Research 111, 978-988.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mohan Amarasiri, Takashi Furukawa, Fumiyuki Nakajima, Kazunari Sei	4. 巻 796
2. 論文標題 Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 148810 ~ 148810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2021.148810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayane Itakura, Fumiyuki Nakajima, Tomohiro Tobino, Kazunari Sei
2. 発表標題 Evaluation of recovery rate of rodent excrement-derived DNA from simulated urban runoff water
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須江渚、古川隼士、中島典之、Amarasiri Mohan、清和成
2. 発表標題 環境RNA解析による衛生動物の高感度検出手法の開発および時間的感度の評価
3. 学会等名 第57回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清和成、須江渚、大知鼓太郎、飯塚光平、前田倅、Amarasiri Mohan、古川隼士、中島典之
2. 発表標題 環境DNA/環境RNA解析による衛生動物検出の時間的感度評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神原 菜, 古川 隼士, Mohan Amarasiri, 中島 典之, 清和 成
2. 発表標題 環境DNA / RNA解析による鼠族検出系の確立と病院排水管からの鼠族検出への適用
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	中島 典之 (Nakajima Fumiyuki)  (30292890)	東京大学・環境安全研究センター・教授  (12601)	
研究分担者	古川 隼士 (Furukawa Takashi)  (90632729)	北里大学・医療衛生学部・准教授  (32607)	
研究分担者	A m a r a s i r i M o h a n (Amarasiri Mohan)  (50815537)	北里大学・医療衛生学部・講師  (32607)	

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
---------	---------