

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18141

研究課題名(和文) 下水中のヒト腸管系ウイルスの網羅的検出手法の確立

研究課題名(英文) Development of a detection method for human enteric viruses in sewage

研究代表者

風間 しのぶ(Kazama, Shinobu)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号：20749444

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)：下水中のヒト腸管系ウイルスの存在は人間社会におけるウイルスのヒトへの感染状況を端的に示していることから、下水中のヒト腸管系ウイルスを効率的かつ網羅的に検出する手法の確立した。その結果、本手法を適用しない場合と比べて40-1000倍の効率でヒトウイルス遺伝子を検出することが可能であった。また、未分類ウイルスとして、これまで日本では検出報告のない16種が検出された。本手法を用いること下水中のヒトウイルスゲノムを効率的に検出できるようになり、これまで報告数が少ないヒト腸管系ウイルスや未分類ウイルスを含め人間社会に存在する種々なウイルスの網羅的検出が可能になった。

研究成果の概要(英文)：The presence of human enteric viruses in sewage reflects the occurrence of infectious gastroenteritis in human population. To enhance efficiency of detecting human viruses in sewage, a detection method targeting human enteric viruses in sewage was developed. As a result, the rates of the human virus genome obtained from the developed method (targeted human viruses.) was 40-1000 times higher than that obtained from a method which targeted all virus genomes. Six unclassified viruses were detected, which have not been reported in Japan. This method succeeded in detecting human virus in sewage efficiently, and will be helpful to understand the distribution of enteric viruses including rare and unclassified viruses in human population.

研究分野：環境工学

キーワード：ヒト腸管系ウイルス メタゲノム 下水 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

下水中のヒト腸管系ウイルスの存在は、人間社会における感染状況(顕性・不顕性感染)を反映している。ノロウイルスをはじめ、主なヒト腸管系ウイルスの存在については、胃腸炎患者サーベイランスや下水からの検出状況の報告によって明らかになりつつある。しかしながら、気候変動によるウイルスの生態変化やグローバル化による輸入感染症により、新たなウイルスや日本においては感染症の発生がゼロとなっていたウイルスが検出される可能性は高い。従って、将来このようなウイルスについても監視し、複数のウイルスについてその動態や感染状況を把握する必要が生じると考えられる。この様な状況に対応する為には、現在ウイルスの検出や同定に広く用いられている PCR 法やシーケンシング法(サンガー法)に替わる新たな手法が必要となる。つまり、ウイルスを個別に検出する(多大な労力を要する)のではなく、複数ウイルスを同時に検出・同定する手法が求められる。そこで本研究では、複数ウイルスを同時に検出・同定可能な次世代シーケンシング(NGS)を用いる。

NGS は 1 回の解析で膨大な塩基配列を読み取ることが可能であるため、複数ウイルス(および種)の塩基配列を同時に決定可能である。NGS は近年ウイルス学でも広く用いられるようになり、下水のメタゲノミック解析(網羅的同定)についての報告もある¹⁾。この報告によると下水に占めるウイルスの存在量は少なく、さらに、検出したウイルスの多くが大腸菌ファージ(82%)であり、ヒトに感染するウイルスは極めて存在量が少ない(1%)事がわかっている¹⁾。したがって、次世代シーケンシングを用いてヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出する為には、大腸菌ファージのゲノムを排除して、より多くのヒトウイルスゲノム(試料が下水であるという特色からその多くはヒト腸管系ウイルス)を NGS に供する事が重要となる。

2. 研究の目的

下水中に存在するウイルスの中で大きな割合を占める大腸菌ファージのゲノムを排除して、より多くのヒトウイルスゲノムを NGS にて検出する。これまで報告されているヒト腸管系ウイルスの多くは 1 本鎖 (+) RNA ウィルスであり、ゲノムの 3'末端にポリ A 鎖を有する。一方、大腸菌ファージゲノムはポリ A 鎖を有さない。これらの特徴を利用し、ポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウィルスのみを NGS に供することで、ヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

ポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウィルスのみを NGS に供することでヒト腸管系ウイルスを網羅的に検出する手法を確立するため、次の 2 課題を設けた。

- 課題 1. 1 本鎖 (+) RNA を有するヒト腸管系ウイルスゲノム増幅手法の確立
- 課題 2. 下水中のヒト腸管系ウイルスの網羅的検出

課題 1 については、モデルウイルスを用いて、考案した下記 2 手法(手法 1 および手法 2)を比較検討し、手法の確立を目指した。ウイルスの同定にはゲノムの一部の情報で可能であるが、種の同定や新規ウイルスの発見には、全塩基長を得ることが望ましい。従って、2 手法について下記の検証 1 及び 2 について比較検討を実施した。

- 手法 1. オリゴ dT プライマーを用いたゲノム全塩基長の増幅
- 手法 2. ランダムプライマーを用いた RNA ウィルスゲノムの増幅

- 検証 1. ウィルスゲノム全塩基長増幅のカバ―率
- 検証 2. 増幅産物の NGS への適用性

課題 2 については、課題 1 で確立した手法を用いて、実際に採水時期の異なる 2 つの流入下水中(2016 年 1 月と 3 月)のヒト腸管系ウイルスの網羅的検出を試みた。また、確立した手法の効果を検証するために、全てのウイルスゲノムを対象に検出した場合とのヒトウイルス検出割合を比較した。

4. 研究成果

課題 1 の検証 1 の結果として、手法 1 ではモデルウイルスゲノムの 3'末端近傍のみが増幅され、全塩基長をカバーした増幅産物を得ることができなかった。一方、手法 2 においては全塩基長をカバーした増幅産物を得ることができた。検証 2 については、手法 1 は polyA 鎖が NGS で得られる配列のクオリティを下げ、且つ得られる配列数を減少させていることが示唆されたが、手法 2 ではこれら問題は見られなかった。検証 1 および検証 2 の結果より、手法 2 によって 1 本鎖 (+) RNA を有するヒト腸管系ウイルスゲノムを増幅することが適当であると考えられた。

課題 2 の結果として、図 1 に手法 2 を用いた場合と、手法 2 を適用せずに全ウイルスゲノムを対象とした手法でメタゲノム解析をおこなった結果を示す。メタゲノム解析で得た全リード数に対するヒトウイルスゲノムリード数の割合が、2016 年 1 月および 3 月に採水した下水試料において、それぞれ 0.2% から 8% および、0.004% から 5.3% に増加した。すなわち、40-1000 倍の効率でヒトウイルスゲノムを検出することが可能であった。また、全ウイルスリード数に対するヒトウイルスの割合については、43% から 74% および 4% から 62% に増加した。

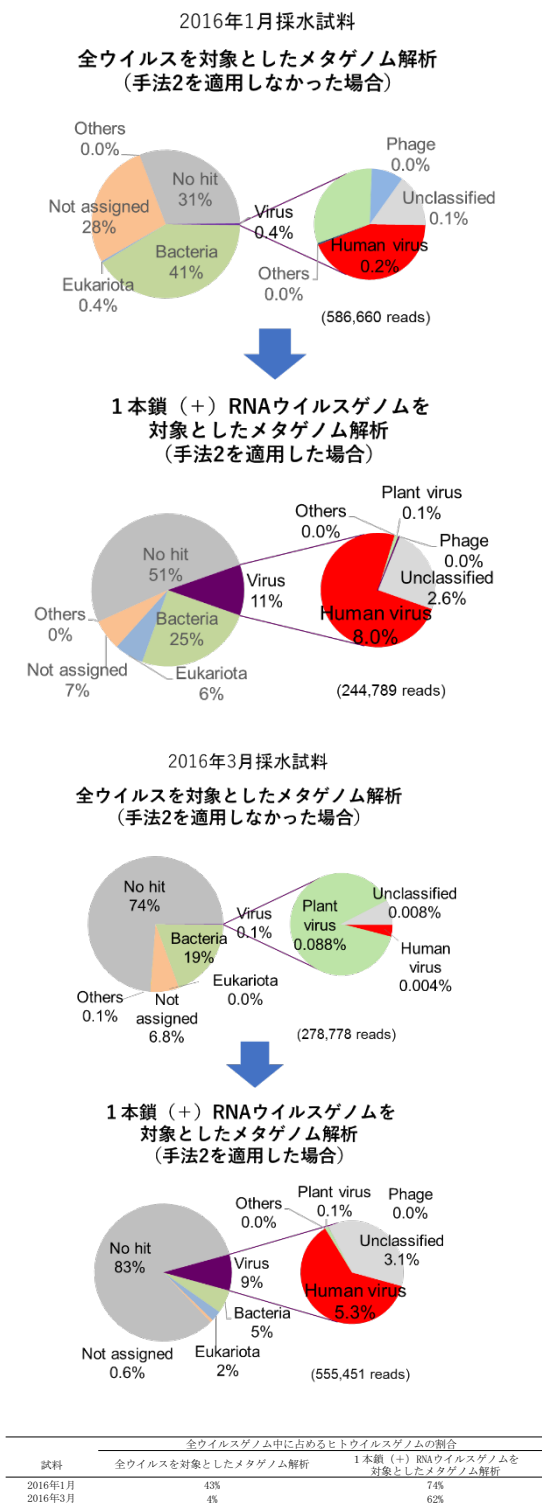


図1 流入下水中(2016年1月および3月採水)のウイルスメタゲノム解析で得た配列の分類

次に、表1に本手法により検出されたウイルスの分類とその配列数を示す。下水試料から最も多く検出されたウイルスは *Norovirus* であり、同サンプルからはリアルタイムPCR法によっても高濃度(下水中に 10^4 copies/mL)

表1 流入下水試料から検出されたウイルスゲノムの分類と配列数(配列数の多い上位15ウイルス)

a 2016年1月

Genome	Host	Family	Genus	Species	Num of reads
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Norovirus	Norwalk virus	19,153
			Unclassified virus	Micalovirus SF1	2,761
				Laverivirus UC1	1,527
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Marine RNA virus SF-2	1,463
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Picalivirus B	602
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Sapovirus	Sapporo virus	327
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 1	110
(+)ssRNA	Plant	Polyviridae	Polyvirus	Turnip mosaic virus	114
(+)ssRNA	Plant	Betaflexviridae	Carlavirus	Shaloke latent virus	84
(+)ssRNA	Plant	Tymoviridae	Unassigned Tymoviridae	Platystilla mosaic virus	84
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Niflavirus	50
dsDNA	Bacteria	Myoviridae	T4-like virus	Enterobacteria phage RB59	35
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexviridae	Potexvirus	Schumbergera virus X	19
Human		Picornaviridae	Sativirus	Sativirus A	15
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexviridae	Potexvirus	Cymbidium mosaic virus	8

b 2016年3月

Genome	Host	Family	Genus	Species	Num of reads
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Norovirus	Norwalk virus	25,279
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Marine RNA virus SF-2	12,028
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Sapovirus	Sapporo virus	8,197
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Laverivirus UC1	4,716
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Picalivirus B	2,411
(+)ssRNA		unclassified virus		Micalovirus SF1	1,220
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 6	786
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexviridae	Potexvirus	Cymbidium mosaic virus	288
(+)ssRNA	Plant	Sicotoviridae	Fabavirus	Broad bean wilt virus 2	69
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexviridae	Potexvirus	Schumbergera virus X	57
(+)ssRNA	Plant	Tymoviridae	Unassigned	Poissettia mosaic virus	49
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 8	48
(+)ssRNA	Plant	Polyviridae	Polyvirus	Turnip mosaic virus	41
(+)ssRNA	Plant	Betaflexviridae	Carlavirus	Carrot carlavirus WM-30308	36
dsDNA	Bacteria	Myoviridae	T4-like virus	Enterobacteria phage RB59	30

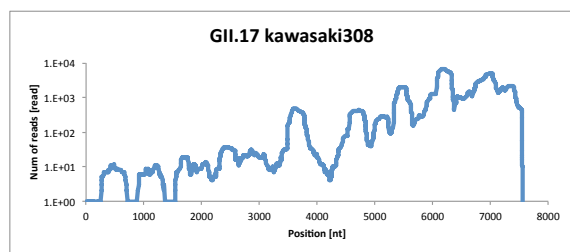


図2 ノロウイルス参照配列 (accession number: LC037415) へのマッピング

で *Norovirus* が検出された。 *Mamastrovirus* については3種が検出されたが、 *Mamastrovirus 6* は Human astrovirus MLB1 に分類され、 *Mamastrovirus 8* は Human astrovirus MLB2 に分類された。これらは近年新たな系統として報告されており、日本においても感染者数の増加が推測された。また、未分類ウイルスとして、これまで日本では検出報告のない Laverivirus UC1, Micalovirus SF1, および Marine RNA virus SF-2 と、我々の研究グループの報告²⁾以外に日本では検出報告の無い Marine RNA virus SF-1, Picalivirus C および Niflavirus が検出された。

2016年3月の試料から得た *Norovirus* (図2b)の配列を *Norovirus* の各遺伝子型/亜型の代表的な参照配列にマッピングしたところ、得た配列はノロウイルス遺伝子群II遺伝子型17 (GII.17) の Kawasaki308 (23,047配列) strain と GII.4 の Sydney2012 variant (1,213配列) であることがわかった。また、 GII.17 Kawasaki308 (accession number: LC037415) については全塩基長の96%を得ることができた(図2)。

これらの結果から、本手法を用いることで、下水中の相対的存在濃度が低いウイルスゲノムを効率的に検出できるようになり、これまで報告数が少ないヒト腸管系ウイルスや未分

類ウイルスを含め、人間社会に存在する様々なウイルスの検出が可能と考えられた。さらに、配列数が多く得られれば、正確な遺伝子型レベルでの同定や、全塩基長の推定が可能であると考えられた。

参考文献

1) Cantalupo PG, et al, Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio* 2(5): e00180-11, 2011. doi: 10.1128/mBio.00180-11.

2) 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 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 巻, III_339-III_349, 2015. doi: http://doi.org/10.2208/jscej.71.III_339.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 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), 査読有, 71-7 巻, III_339-III_349, 2015 年, http://doi.org/10.2208/jscej.71.III_339.

[学会発表] (計 5 件)

① Shinobu Kazama, Yoshifumi Masago, Takayuki Miura, Yoshimitsu Konta, and Tatsuo Omura, Distribution of human caliciviruses identified in municipal wastewater by metagenomic analysis using a newly developed method, The 6th International Calicivirus Conference, Savannah, GA, USA, October 9-13, 2016.

② Shinobu Kazama, Yoshifumi Masago, Takayuki Miura, Yoshimitsu Konta, Tatsuo Omura, Development of a selective-metagenomic method for human enteric viruses in wastewater, 5th Food and Environmental Virology Conference, Kusatsu, Gunma, Japan, September 13-16, 2016.

③ 風間しのぶ, 真砂佳史, 三浦尚之, 今田義光, 大村 達夫, 下水中のヒト消化器ウイルスの検出を目的とした選択的メタゲノム解析手法の開発. 第 53 回環境工学研究フォーラム, 2016 年 12 月 6-8 日, 北九州国際会議場 (北九州市) .

④ 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 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, 第 52 回環境工学研究フォーラム, 2015/11/27-29, 日大工学部キャンパス (郡山市) .

⑤ 風間しのぶ, 真砂佳史, 当广謙太郎, 今田義光, 相馬奈央, 今川稔文, 鈴木陽, 劉曉

芳, 齊藤繭子, 押谷仁, 大村達夫, 次世代シーケンサーを用いた下水モニタリングによるノロウイルス流行状況の把握, NGS 現場の会第四回研究会, 2015/7/1-7/3 つくば国際会議場 (つくば市) .

[その他]

① The 5th Food and Environmental Virology conference vest poster award . Title: Development of a selective-metagenomic method for human enteric viruses in wastewater. Authors: Kazama S, Masago Y, Miura T, Konta Y, Ihara M, Tanaka H, Omura T., 2016.

② 土木学会 第 52 回環境工学研究フォーラム論文賞. 論文名: 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. 著者: 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 2015 年.

6. 研究組織

研究代表者

風間 しのぶ (KAZAMA, SHINOBU)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号: 20749444