

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04745

研究課題名（和文）感染症早期発見に向けた流入下水中胃腸炎ウイルスの網羅的検出と流行指標の開発

研究課題名（英文）Comprehensive detection of enteric viruses in sewage and development of indicators of their prevalence for early detection of infectious gastroenteritis

研究代表者

風間 しのぶ（Kazama, Shinobu）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

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）：選択的メタゲノム解析により得た未知配列と下水中濃度をノロウイルス（NoV）と比較した結果、1つの配列がNoVと逆の濃度変動を示したが相関はなかった。一方、下水中のNoVとアイチウイルスが同様の濃度変動を示す（正の相関）ことが確認され、感染性胃腸炎の指標としての可能性が示唆された。また、選択的メタゲノム解析の改善を検討したところ、rRNA除去はssRNAウイルス検出を妨げること、ハイブリッドアセンブルによる解析がウイルス同定の信頼性を高め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

本申請研究では、下水試料からの新規および既知のヒトウイルスを網羅的に検出するための手法における改善点を提案するとともに、下水から検出された未知遺伝子配列やウイルスの感染性胃腸炎流行指標としての可能性を示した。今後ますます進むであろう社会の国際化や気候変動により、病原微生物の生態が変化し、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脅威が高まると考えられる。人間社会におけるウイルスの多様性や感染症の発生程度を把握することは、感染症対策を講じる上で不可欠である。本研究成果は、そのための新たな知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：The concentrations of unknown sequences in sewage obtained by selective metagenomic analysis were compared with norovirus (NoV). As a result, one sequence showed an inverse concentration variation with NoV, but there was no correlation. On the other hand, Aichi virus was identified that showed a similar variation in concentration to NoV in sewage (positive correlation), suggesting its potential as an indicator of infectious gastroenteritis. Improvements in selective metagenomic analysis were also investigated. It was suggested that rRNA removal hindered the detection of ssRNA viruses and that analysis by hybrid assembly could improve the reliability of virus identification.

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 感染性胃腸炎 下水

1. 研究開始当初の背景

今後ますます進むであろう社会の国際化や気候変動により、病原微生物の生態が変化し、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脅威が高まると考えられる。人間社会におけるウイルスの多様性と感染症の発生状況を把握し、ウイルス感染症を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。

これまで、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタゲノム解析にて下痢症便から新規ウイルスの検出が試みられているが、ヒト便試料 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。一方、流入下水には胃腸炎ウイルス感染者が排出する病原ウイルスが集積されるため、流入下水中のヒトウイルスを網羅的に検出することができれば、処理区域内における感染状況を明らかにすることが可能となる。これまで、ウイルスの検出には各ウイルスを個別に検出する PCR 法が主に用いられているが、あらゆる胃腸炎ウイルスによる感染症の発生状況 (ウイルス濃度) を把握・監視するには非効率的な手法である。一方、NGS は一度で複数のウイルスを検出可能であるが、半定量的な検出しかできず、ウイルス感染症の発生程度を推定することが困難である。また、高頻度でウイルスモニタリングをするには、現状、労力および費用を要する。したがって、ウイルス感染症発生度を簡易にモニタリング可能とする指標が求められる。

2. 研究の目的

ヒトウイルスを効率的に検出する、ポリ A 鎖を有する ssRNA を選択的メタゲノム解析する手法を活用し、下水試料から新規ウイルス、および、既知ウイルスを網羅的に検出し、検出されたウイルス (既知・未知) を用いて、ウイルス感染症を示す流行指標の開発することを目的とする。

また、当初の目的にはなかったが、非流行期など、腸管系ウイルスが低濃度で存在する下水中からも効率的に検出可能とするために、選択的メタゲノム解析手法の改善も検討した。

3. 研究の方法

(1) 未知ウイルスの検出と胃腸炎ウイルスによる感染症流行指標の検討

選択的メタゲノム解析手法により、流入下水中の既知および未知ウイルス検出を試みた。選択的メタゲノム解析で得た遺伝子配列には、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 (以降、No hit 配列) が検出されることから、No hit 配列にはヒトウイルスゲノムが高割合で含まれる。複数の試料から得た膨大な No hit 配列を De novo 解析することで、未知ウイルスの可能性が考えられるゲノム (以降コンティグと呼ぶ) の検出を試みた。加えて、検出したコンティグに対して特異的な検出系 (プライマーおよびプローブ) を設計し、定量 PCR にて下水検体中濃度を定期的にモニタリングした。

また、流入下水中の主な胃腸炎ウイルス濃度の増減と、前述のコンティグやウイルスの濃度増減を相関分析することで、感染者の増減変化との相関あるいは逆相関について解析した。

なお、流入下水サンプルは 1~2 週間に 1 度の頻度でサンプリングし、1~2 ヶ月に 1 度の頻度で、メタゲノム解析に供する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の流行により、当初予定していた下水試料のサンプリングが困難となったため、一部、過去に採取した下水サンプルを使用して検討をおこなった。

(2) 選択的メタゲノム解析手法の改善

下水中ウイルスの網羅的検出手法について、非流行期時のように腸管系ウイルスが特に低濃度で存在する下水からの検出効率を向上するため、現行手法の改善を検討した。本研究がターゲットとしているウイルス (ssRNA ウイルス) を選択的に検出するには、ターゲット以外のゲノムである DNA の除去やリボソーム RNA (rRNA) などを排除する必要がある。現行の手法では、DNase 処理を 1 回実施しているが、複数回処理することによる検出効率の上昇を検討した。また、試料中の相対量が多い細菌由来のリボソーム RNA (rRNA) が、ターゲットとするウイルスゲノム検出率を低下させることが考えられる。したがって、試料中のリボソーム RNA 除去の有無によるターゲットゲノムの検出効率についても調査した。これら検討にあたり、ssRNA ウイルスであるマウスノロウイルス (MNV) を添加した下水試料を従来の手法で濃縮・核酸抽出したのちに、DNase 除去および rRNA 除去を実施し、定量 PCR およびメタゲノム解析によって、検出効率の改善を確認した。定量 PCR では DNase や rRNA 処理によるターゲットゲノムの損失有無を、MNV 濃度を分析することで評価した。メタゲノム解析では、処理有無による ssRNA ウイルスの配列数や多様性によって評価した。

さらに、異なるシーケンシングや解析手法、すなわち、ショートシーケンシング、ロングシーケンシング、ハイブリッドアセンブル (ショートとロングシーケンシングの配列をアセンブルする) による、ヒト腸管系ウイルスの検出効率の改善を検討した。

4. 研究成果

(1) 未知ウイルスの検出と胃腸炎ウイルスによる感染症流行指標の検討

選択的メタゲノム解析で得たコンティグのうち、3つのコンティグについて検出系を設計することができた。それらコンティグA, B, およびCについて下水中の濃度をモニタリングした結果をノロウイルス(NoV)の濃度とともに図1に示す。コンティグAとBについては、ほぼ全ての試料から検出されたが、NoVよりも低濃度で検出された。一方、コンティグCについては、NoVよりも高濃度で検出され、また、NoV濃度変化とは逆の変動(NoV濃度が上昇するとコンティグC濃度が低下し、NoV濃度が低下するとコンティグC濃度が上昇)がみられた。そこで、NoV濃度とコンティグC濃度について相互相関分析を行ったが、相関は見られなかった。また、アイチウイルス(AiV)がNoVと同様の濃度変動することが観察され(図2)、相互相関分析では、Lag0で正の相関(相関係数0.495)が見られた。

コンティグCやAiVは病原微生物(NoV)よりも高濃度で検出されていることから、感染性胃腸炎の発生状況を示す指標として有用である可能性があり、モニタリングを継続し、検証することが望まれる。また、これらウイルスや配列のノロウイルス感染症との関係解明が期待される。

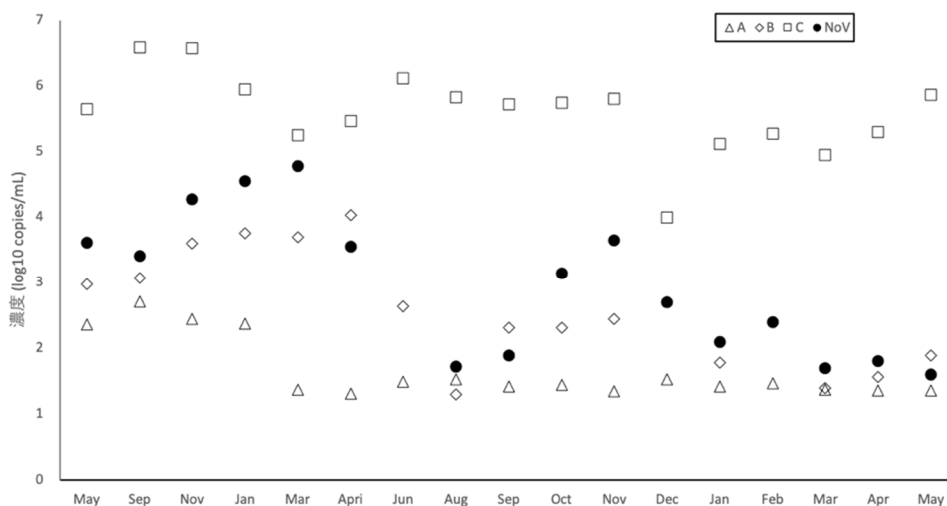


図1 下水中のコンティグ(A, B, C)とNoVの濃度変化

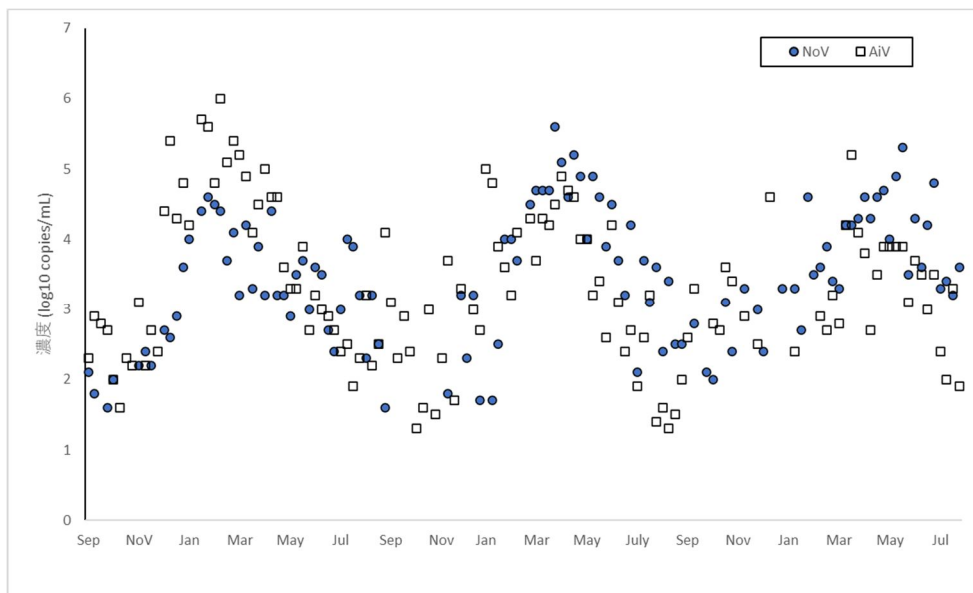


図2 下水中のNoVとAiVの濃度変化

(2) 選択的メタゲノム解析手法の改善

DNase 処理は、回数が多いほど(2回)、サンプル中の DNA 量は減少した。一方、MNV ゲノムは DNase 処理前の濃度から変化がなかったことから、DNase 処理による ssRNA ウイルスゲノムの損失は無視できると考えられた。しかしながら、メタゲノム解析では、細菌やウイルス由来の DNA が多く検出されており、2 回の DNase 処理では DNA を十分排除できないことが分かった。

rRNA 除去を実施した場合、実施しない場合よりも MNV 濃度が 1.1log 減少した。また、シーケンシング結果を比較すると、rRNA 除去を実施した場合、ターゲットのウイルス(ssRNA ウイルス)が不検出となった。

したがって、DNase 処理を複数回実施することで、選択的メタゲノム解析による ssRNA ウイルスの検出効率は上がると考えられるが、特に試料中のターゲットゲノムの相対的な存在量が極度に少ない場合、試料中の rRNA を除去しないほうが、メタゲノム解析において ssRNA ウイルスの配列数や多様性が保たれることが示された。

異なるシーケンシングや解析手法による ssRNA ウイルスの検出結果を比較すると、ロングシーケンシングでは、ショートシーケンシングで検出されたウイルスの一部が検出不可となった。これは、ssRNA ウイルスゲノムの抽出・精製量が少ないこと、また逆転写効率が低く、シーケンシングに供する長鎖配列数やその質が不十分であったと考えられた。

ハイブリッドアセンブルでは、ショートシーケンシングと同様の ssRNA 検出効率となった。さらに、ショートシーケンシングによる検出よりも、参照配列に対するカバレッジが改善した。すなわち、ハイブリッドアセンブルによって、ショートシーケンシングより、長いヒト腸管系ウイルス配列を得ることができ、ウイルス同定における信頼性が高まることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Yui ARAI, Kumiko OGUMA, Satoshi TAKIZAWA, Shinobu KAZAMA |
| 2 . 発表標題 Comparison of Methods in Viral Metagenomic Analysis for the Detection of Human Enteric Viruses in Sewage |
| 3 . 学会等名 Water and Environment Technology Conference |
| 4 . 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 新井 結, 風間 しのぶ, 小熊 久美子, 滝沢 智 |
| 2 . 発表標題 ヒト 腸管系 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 改善 |
| 3 . 学会等名 第 60 回環境工学研究フォーラム |
| 4 . 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Shinobu Kazama, Shunsuke Oka, Indrastuti, Kensuke Kido, Satoshi Takizawa |
| 2 . 発表標題 Evaluation of fecal contamination and potential fecal indicators in groundwater from private wells in rural Indonesia |
| 3 . 学会等名 The 8th International Society for Food and Environmental Virology (国際学会) |
| 4 . 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Shunsuke Oka, Shinobu Kazama, Kumiko Oguma, Satoshi Takizawa |
| 2 . 発表標題 Identification of fecal contamination source and enteric viruses in groundwater in the Special Region of Yogyakarta province, Indonesia |
| 3 . 学会等名 The 13th International Symposium on Southeast Asian Water Environment (国際学会) |
| 4 . 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡 俊輔, 風間しのぶ, 小熊久美子, 滝沢 智 |
| 2. 発表標題 ジョグジャカルタ特別州での多様な衛生設備下における地下水糞便汚染状況の分析 |
| 3. 学会等名 第57回 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |