

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

所 属 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究分担者 黒田誠

研究要旨：未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行，そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある．その危険性に対する確な対処法を立案・整備する上で バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つと考える．次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA sequencer: NGS）のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ，有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている．

世界的な取組としてコーネル大学 Mason 博士の主催の元，Metagenomics & Metadesign of Subways & Urban Biomes (MetaSUB) プロジェクトが進行中である．ニューヨークの地下鉄の拭き取り調査により得られた検体のメタゲノム DNA 解析し，多種多様な細菌種を同定し，地図上にマップする試みである (<http://graphics.wsj.com/patho-map/?sel=bact>)．都市における感染症リスクを把握するため，ゲノミクスを駆使して評価するアプローチであり，環境保全等の基盤データとして有効に活用されるべきだろう．本計画では，東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて，特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた．ヒト配列が有意な採取箇所やレンサ球菌属配列の多い駅等へ大まかに分類されることが分かった．手すり等の表面は利用者が直接接触する可能性があり，基本的にヒト配列が際立って多い場所であってもおかしくないと推測される一方，ヒト常在菌の *Streptococcus* レンサ球菌属の配列が多数を占める採取場所もあった．各駅の特徴を示した結果を得ることができたが，ほんの数カ所を拭いて検査しただけに過ぎず，一時的な汚染を検出したスナップショットであることも念頭において評価したほうが良いだろう．

今回の試行では薬剤耐性菌や病原体を検出することは無かったが，環境サンプルのメタゲノム解析法による検出感度・特異度に結果が左右されるため，適正な採取場所の選定や季節変動の影響等，今後評価すべき課題だと考えている．

研究協力者

関塚剛史・国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

山下明史・国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

加藤健吾・国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

神沼英里・国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 大量遺伝情報研究室

鈴木治夫・慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行，そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている．最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより，今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった．最先端の革新技術を応用し，効率的かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え，WHO 指定バイオテロ病原菌および未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている．

今年度は環境汚染と感染症リスクを相互評価する観点から、公共交通機関の手すり等の付着する感染性因子（推定）に着目し、採取付着物のメタゲノム解析法にて汚染実態の調査を行った。

B. 研究方法

1. 公共交通機関の環境サンプル採取

公共交通機関でのサンプル採取にあたり、東京都交通局電車部営業課に研究計画の骨子と重要性をご説明し、事前の取り決めを遵守することを前提に平成 28 年 2 月 5 日付けでサンプル採取の許可を得た。対象は大江戸線の周回の各駅を広範に選定し Puritan Opti-Swab Liquid Amies Collection & Transport System を用いて手すりおよびトイレドアの付着物を拭き取り回収した。採取日時は平成 28 年 2 月 6 日と平成 28 年 2 月 24 日の 2 回に分けて実施した。採取日のうちに拭き取りサンプルを冷凍保管した。

2. DNA 精製および増幅

拭き取りサンプルを室温溶解し、十分にボルテックスにて攪拌後、浸出液 100 μ l を DNA 精製に供試した。ZymoResearch ZR Soil Microbe DNA MicroPrepTM の手順書に従い、ビーズ破碎からカラム精製と環境不純物の排除を行って純度の高い DNA を精製した。

DNA は高感度の Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で濃度測定した。

微量 DNA 濃度であったサンプルには超純度 phi29 DNA polymerase (関東化学 http://www.kanto.co.jp/products/siyaku/baoidenshi/idenshi_phi29/phi29_dna_polymerase.html) で NGS ライブラリーの作成に必要な DNA 量まで増幅した。

3. メタゲノム解析

採取サンプルに含まれる精製 DNA は多様な生物種の混合物であると推定されるため、DNA をランダムに配列解読するメタゲノム解読の NGS ライブラリーを作成した。Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina) と 96 index アダプターを用いてインサート長・平均 200-bp のライブラリーを作成した。調整 NGS ライブラリーは 96 index にて分別可能であるため、96 サンプルまとめて MiSeq reagent kit v3 (150 cycle) で配列解読し、解読後にインデックス振り分けによりサンプル個別の解読リードを取得した。1 サンプルあたり平均 20 万本の 150-mer 解読リードが取得できるよ

う調整した。

4. 生物群集の Taxonomy 分類

150-mer 解読リードから skewer スクリプトにてアダプター配列および精度の低い塩基 (Phred Quality score ≤ 15) の除去トリミングを行った。信頼性の担保できた解読リードを公共データベース (NCBI nt および wgs データベース、2016/05/13 版) に対して塩基配列同士の megablast 相同性検索を行った (閾値: blast score ≥ 50 , Top hit のみ抽出)。相同性検索の結果は MEGAN v6 (チュービンゲン大学) にて生物種ごとに検出率を評価した。MEGAN に内包される主座標分析 (Principal Coordinate Analysis; PCoA) を用いて採取場所毎に分類される群集を分類した。

【倫理面への配慮】

国立遺伝学研究所にて「都市公共空間の DNA 環境評価地図構築」の申請課題で倫理申請し、包括承認を受けた。

C. 研究結果

都営地下鉄大江戸線の新宿西口から都庁前までの 23 駅から各 4 箇所を採取し、計 92 箇所の採取サンプル (+コントロールとして 4 サンプル) を本実験に使用した。精製 DNA の回収量が測定限界以下の想定より少なかったため、phi29 DNA polymerase を使った Rolling Circle Amplification 法にて増幅バイアスの少ない DNA の量と質を確保した (http://www.kanto.co.jp/products/siyaku/baoidenshi/idenshi_phi29/phi29_dna_polymerase.html)。

次世代シーケンサー MiSeq にて 96 サンプルをメタゲノム解析し、サンプルごとの特徴を群集として主座標分析した結果、ヒト配列が有意なサンプルやレンサ球菌属配列が多いサンプル等へ分類されることが分かった (図 1)。手すり等の表面は利用者が直接接触する可能性があり、基本的にヒト配列が際立って多い採取場所があってもおかしくないと推測された。一方、ヒト常在菌 (A 群レンサ球菌や肺炎球菌等の病原菌も含む) としてヒトとの関連性の高い Streptococcus レンサ球菌属の配列が多数占める採取場所もあった。雑巾等の清掃用具の悪臭の原因菌と近縁な環境細菌 Enhydrobacter が有意な採取場所もあり、この環境細菌に汚染しているよりもむしろ、清掃により清潔に維持されていると推測もできた。

PCoA では大まかな群集団の分類になるため、各駅・各採取場所の特徴が分かりにくいため、WordCloud 法にて図示化した(図2)。

某駅の S2(手すり)でラット等の齧歯動物の寄生虫として知られる Strongyloides と環境細菌 Burkholderia を検出した(図3)。

某駅の S1S2(手すり)から海浜近くの駅ならではの藍藻類の配列を検出した(図4)。

96 サンプル中 27 サンプルの DNA 量が少なく解析に適していない(<10,000 リード)ものも含まれることから、駅構内の日常清掃により比較的清浄な状況が保たれていると考えられた。

D. 考察

サンプルを拭った箇所によってはヒト配列(Homo)の検出量にバイアスがあり、清掃作業における影響が想定される。他、解読リード数が想定以下の少ないサンプルもあるため、改めて情報解析を試行する必要もあるだろう。各駅で特徴的な配列が検出される事例があったが、ほんの数カ所を拭って検査しただけに過ぎず、一時的な汚染を検出したスナップショットであることも念頭において評価したほうが良いだろう。

今回の試行では薬剤耐性菌や病原体を検出することは無かったが、環境サンプルのメタゲノム法による検出感度・特異度に左右されるため、不正確なデータ取得のまま有無についての議

論は成り立たないと考えられる。

E. 結論

東京近郊を周回する大江戸線の各駅から手すり等の環境サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム DNA 解析法にて、特徴的な病原体や薬剤耐性菌の検出を試みた。環境中の病原体検出に対してメタゲノム解析を導入する場合の基盤的遺伝子情報(大規模情報)を得た。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

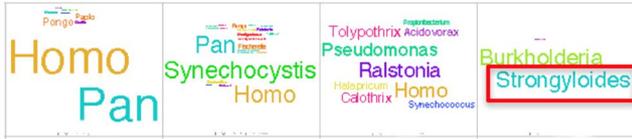
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

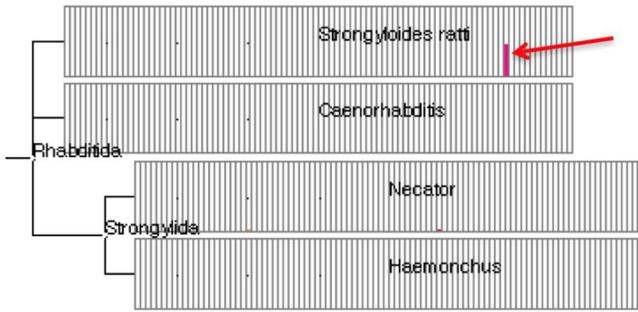
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



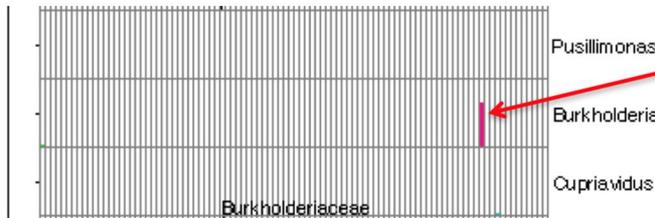
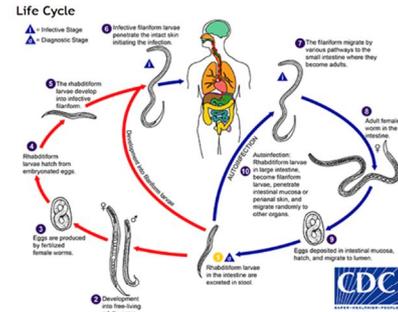
図2 各駅の採取場所から検出された生物種の種類・存在比を図示化した WordCloud. 赤 で囲んだ採取場所は多様な生物種が特定された箇所を示す. 複数種が検出されたからといって, 汚染度が高いことと相関するわけではない.



Strongyloides 寄生虫
<http://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>



ラットの寄生虫



Burkholderia 環境細菌

図3 某駅のメタゲノム結果の特徴．S2（手すり）でラット等の齧歯動物の寄生虫として知られる Strongyloides と環境細菌 Burkholderia を検出した．



• 附着性藍藻

- ネンジュモ目 Nostocales
 - Calothrix
 - ヒゲモ Rivularia
- スチゴネマ目 Stigonematales
 - Brachytrichia



<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E8%97%BB%E5%A0%B4>

図4 某駅のメタゲノム結果の特徴．海浜に近い駅の特徴である藍藻類の配列を検出した．