

ターゲットキャプチャー法を用いたヒト臨床検体からの  
呼吸器ウイルスゲノムシーケンス竹前喜洋<sup>†</sup> (国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター  
第八室 室長)

## 1 はじめに

次世代シーケンス技術 (以下, next generation sequencing : NGS) は, 公衆衛生に限らず, 生態学, 進化学などおおよそ全ての生物学的現象に関連する研究にとって必要不可欠なツールであり, 規模の大小を問わなければ研究室単位で運用されているほど日常的なものとなりつつある。2020年に始まったSARS-CoV-2によるパンデミックでは, 世界中の研究者がNGSを用いてSARS-CoV-2の塩基配列を決定し, その配列を即座に公共データベースに登録することで, リアルタイムにウイルスゲノム配列をモニタリングすることが可能となった。今後も, NGSは新たな変異株の出現監視など新興感染症の制御への活用が期待されている [1]。NGSは, 一度に大量のDNA (あるいはRNA) をシーケンスすることが可能ということが特長であり, 動物やヒトの臨床検体 (例えば, 鼻咽頭拭い液や臓器乳剤) や環境検体など検体中に存在するゲノムDNA (あるいはRNA) を網羅的に解読するメタゲノム解析を行うことができる。メタゲノム解析は, 対象とする微生物 (細菌やウイルスなど) を分離・培養を介さずに検体中からゲノム配列を直接解読できるため, 迅速性に優れるだけでなく, 分離・培養が困難な微生物のゲノム配列も得られることから未知の病原体の発見に繋がる可能性がある [2]。しかしながら, ヒトや動物の臨床検体中には宿主や細菌由来のゲノムと比較して, ウイルスのゲノムはごくわずかにしか含まれないため, メタゲノム解析では対象とするウイルスの全ゲノム配列を得ることができない場合がある [3]。特に, 鼻咽頭拭い液中のインフルエンザウイルスやSARS-CoV-2といった呼吸器感染症ウイルスのゲノムの全塩基配列は, ウイルスゲノムをPCR増幅することなしに得ることは困難であり, 分離したウイルスを元にウイル

スの全ゲノム配列が決定される場合が多い。

こうした臨床検体中の極微量なウイルスを標的としたゲノム解析を実施するため, ターゲットエンリッチメント法として, アンプリコン法とターゲットキャプチャー法 (またはハイブリダイゼーションキャプチャー法などさまざまな呼称があるが, 本稿ではターゲットキャプチャー法に統一する) の2つの方法がよく用いられている。アンプリコン法は, 多数の特異的プライマーを用いたPCRにより標的ゲノムの全領域を増幅したライブラリー (NGS用のサンプルで, 5'末端と3'末端にそれぞれ配列既知のアダプターが付加した同程度の長さのDNA断片の集まりのこと) を作製してまとめてシーケンスを行う方法である [3] (図1)。SARS-CoV-2の全ゲノム配列の解析には本法が広く用いられており, 臨床検体から直接ウイルスゲノムをシーケンス解析することが可能である [4-6]。一方のターゲットキャプチャー法は, 臨床検体から抽出した核酸より作製したNGSライブラリーに対してターゲット (標的) となるゲノム配列に相補的なプローブを用いてNGSライブラリー中の標的を捕獲 (キャプチャー) し, 濃縮してシーケンスを行う方法である [3, 7, 8] (図1)。プローブは標的ゲノム全体をカバーするように設計された多数の80-120mer程度のビオチン化DNAまたはRNAであり, ライブラリー中の特定の領域にハイブリダイズさせてからウォッシュアウトすることで, メタゲノム解析と比較して標的以外のゲノム (宿主DNAなど) の数を相対的に減らすことで標的に対するシーケンス解析を高感度に実施することが期待できる。

ターゲットキャプチャー法では, プローブとターゲット領域のミスマッチに対しては高い許容性が報告されており [9], また, さまざまな病原体のゲノム配列に由来するプローブを同時にパネル化することが可能であり, 標的を広げて複数の病原体 (場合によっては, 数千種の病原体も可能) のゲノムを網羅的に検出するだけでなく,

<sup>†</sup> 連絡責任者: 竹前喜洋 (国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター第八室)

〒208-0011 武蔵村山市学園4-7-1 ☎・FAX 042-848-7218 (内線: 3723) E-mail: ntakemae@niid.go.jp

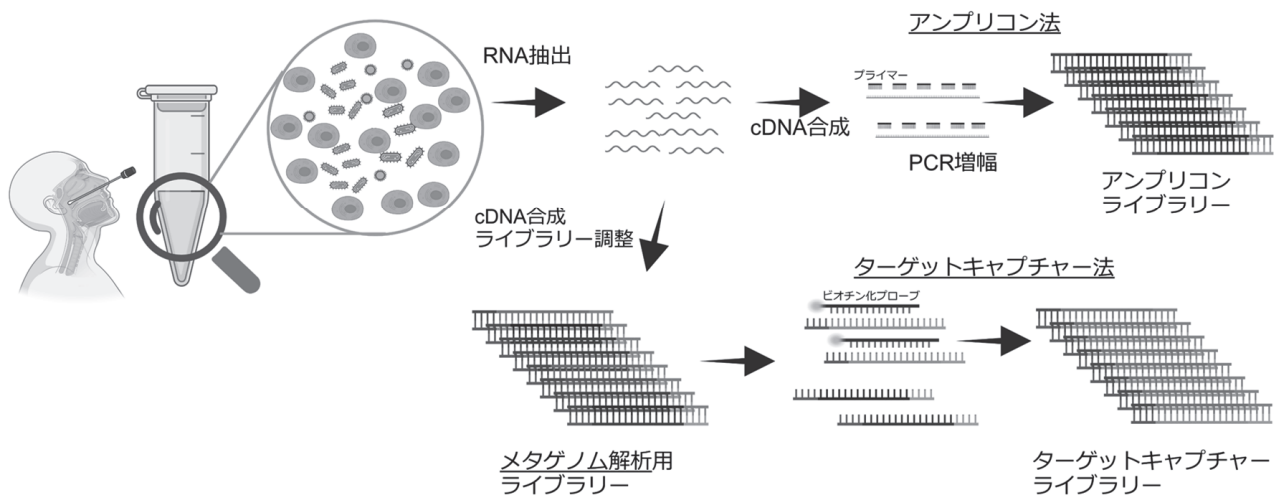


図1 NGS ライブラリー調整の模式図 (Created with BioRender.com)

ターゲットキャプチャー法では、メタゲノム解析用ライブラリーから標的とするゲノム配列をもつライブラリーをビオチン化プローブによりハイブリダイゼーションし濃縮する。アンプリコン法では、cDNA合成後に標的とする領域を特異的なプライマーでPCR増幅した後にライブラリー作製を行う。

プローブ配列に似た塩基配列をもつ未知の病原体や新たな変異株の探索にも有用である。すでに複数の病原体を対象としたDNA（あるいはRNA）プローブパネルが複数の試薬メーカーより販売されている。さらに、標的とする病原体をカスタマイズ可能なプローブパネルの設計・販売も行われており、ヒトのみならず動物由来の臨床検体への応用によるワンヘルスアプローチの一つのツールとなりつつある [9, 10].

本稿では、ターゲットキャプチャー法のヒト臨床検体への有用性を評価するために、Twist Bioscienceより販売されているTwist Comprehensive Viral Research Panel（本パネルには、人獣共通感染症病原体やヒトまたは動物感染症病原体を含む3,153種類のウイルス(15,488株)に由来する配列がプローブとして含まれている (<https://www.twistbioscience.com/products/ngs/fixed-panels/comprehensive-viral-research-panel?tab=overview>))を用い、A型インフルエンザと診断された患者から採取した臨床検体に対してNGSを実施した結果について報告する。

## 2 ヒト臨床検体への応用

公立昭和病院（東京都小平市）で呼吸器症状を呈しA型インフルエンザ陽性（H1N1pdm09）と診断された患者から採取した検体（鼻咽頭拭い液）より抽出したRNAを用いた。評価用検体は、リアルタイムRT-PCRでA型インフルエンザウイルスのM遺伝子に対するCt値が30以下のものから1検体選抜し、RNA抽出液中には600コピー/ $\mu$ l程度のM遺伝子が含まれることを確認した。

ターゲットキャプチャーライブラリーは、Twist Bio-

science推奨プロトコルによるDNAライブラリー作製後にTwist Comprehensive Viral Research Panelと16時間ハイブリダイゼーションし、調製した。ターゲットキャプチャー法を比較評価するため、同じ検体RNAを用いてメタゲノム解析用ライブラリーをNEB-Next Ultra II RNA Library Prep Kit for Illuminaを用いて作製した。それぞれのライブラリーを1 nMに希釈した後に、Miseq Reagent kit v2(Illumina, San Diego, CA, U.S.A.)を用いてIllumina Miesqでシーケンスを行った。

生成されたシーケンスリード（NGSで得られる短い塩基配列）は、CLC Genomics Workbenchソフトウェア（バージョン21.0.4）にて解析した。各NGSライブラリーで得られた総リード数を100万リードにダウンサンプリングした後に、A型インフルエンザウイルス（A/California/04/2009（H1N1））を参照配列としてマッピング（得られたリード配列を参照配列に並べる解析）し、マッピングされたリード数、平均カバレッジ（深度とも呼ばれる）、カバレッジカバー率（シーケンスされたターゲット領域の塩基長の割合）など各種NGSデータを評価した。

ライブラリー作製法の違いによるマッピング結果を表と図2に示した。A型インフルエンザウイルスゲノムは8つの遺伝子分節（PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS遺伝子）から構成されている。メタゲノム解析用ライブラリーでは、A型インフルエンザウイルスの参照配列にマッピングされたリードは、100万リード中のわずか0.001%であり（表）、A型インフルエンザウイルスの全ゲノム長に対して取得できた配列長は、7.8%であった。また、5つの遺伝子分節（各分節1~3リード）

表 ヒト臨床検体を用いたメタゲノム解析とターゲットキャプチャー法による NGS データの比較

	各ゲノムの割合 (%)			平均カバレッジ (×)	カバー率 (%)
	ヒト	A 型インフルエンザウイルス	その他		
メタゲノム解析	98.5	0.001	1.5	0.1	7.8
ターゲットキャプチャー法	95.7	1.9	2.4	207.34	98.2

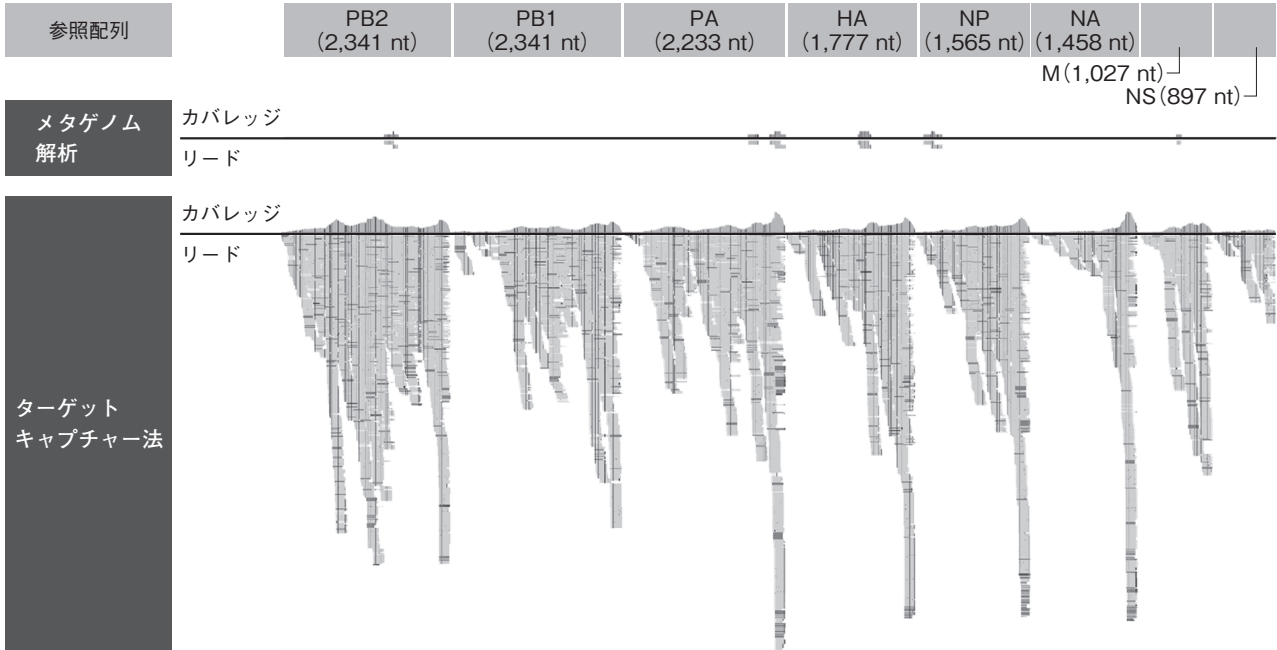


図2 メタゲノム解析（上段）とターゲットキャプチャー法（下段）による NGS データのマッピングの可視化  
カバレッジとリードマッピングをそれぞれ示した。参照配列には、A 型インフルエンザウイルス A/California/04/2009 (H1N1) (EPI\_ISL\_376192) を用い、遺伝子分節ごとにマッピングした。各解析法の下段側の一つ一つの短い線が NGS で得られた各リードを表している。

しか取得できず (図2), NA 遺伝子由来のリードは得られなかったため NA 亜型を同定できなかった。一方で、ターゲットキャプチャー法による NGS では、参照配列にマッピングされたリード数は全ての遺伝子分節で劇的に上昇し (図2), A 型インフルエンザウイルスゲノムの割合は、100 万リード中 1.9% となり、全ゲノム長の 98.2% をカバーする配列が得られた (表)。メタゲノム解析と比較して、ターゲットキャプチャー法による A 型インフルエンザウイルス由来のリード数は、2,000 倍程度多かった。ただし、ターゲットキャプチャー法においてもヒト由来ゲノムのリード数は依然として 95.7% と大多数を占めていた。

### 3 考察と今後の課題

以上、本稿では、詳細は述べないが、ターゲットキャプチャー法を用いることで H1N1pdm09 以外の亜型の A 型インフルエンザウイルス、SARS-CoV-2、エンテロウイルス D68 などさまざまな呼吸器感染症ウイルスのヒト臨床検体からのゲノム解読だけでなく、同時感染し

た複数のウイルスゲノム解析も可能であった。さらに、標的とするウイルスゲノムが RNA 抽出液中に 100 コピー/ $\mu$ l 以下の検体 (Ct 値としておおよそ 30 以上) においてもウイルスゲノム配列が得られたことから、ターゲットキャプチャー法によるウイルス同定能は、PCR 法と同程度であることも確認できた。NGS の場合はウイルス同定と同時にウイルスゲノム配列も得られて情報が多岐に渡るため、変異株出現の監視、海外からの侵入状況の監視、国内での流行状況の監視などに活用することも可能で、そのメリットは非常に大きい。

NGS ライブラリーの調製試薬、シーケンサーの種類、検体の種類、プローブパネルなど条件はさまざまではあるが、ターゲットキャプチャー法のウイルスゲノム解析への有用性はさまざまな研究で実証されてきた [8]。Wylezich C ら [9] (2021) は、国際的に監視が必要な動物ウイルス (アフリカ豚熱ウイルス、口蹄疫ウイルスなど) や人獣共通感染症ウイルス (エボラウイルス、マールブルグウイルスなど) など 35 種類のウイルスを対象とした RNA プローブパネルを設計し、さまざまな



動物由来の臨床検体（脳や脾臓など）からのゲノム解析の効率化を図るなど、ターゲットキャプチャー法をワンヘルスアプローチのツールとしての活用を行っている[9].

現在、遺伝子診断法としてはPCR法（リアルタイムPCR法を含む）が使われることが多い。PCR法はプライマー／プローブ領域内の塩基置換によって標的が全く検出できなくなる可能性があるが、包括的な病原体を標的にするプローブパネルを用いたターゲットキャプチャー法はプローブに対する変異許容性も高く、変異の影響をそれほど受けずに病原体ゲノムを検出することが可能である。このため既知の病原体と近縁な未知ウイルスなども同定できる可能性があり、パンデミックポテンシャルを有する新規ウイルスの早期発見にも貢献できるかもしれない。また、PCR法においては、特定の病原体が陽性となった場合、それ以上の検査は行われないことが多く、その他の複数の異なる病原体による同時感染を見逃す可能性があるが、ターゲットキャプチャー法では、標的を事前に決定する必要がないため、さまざまなウイルスを同時に検出できるという利点もある。

検出感度の向上と検索対象の拡大は、ターゲットキャプチャー法の大きな利点となる一方で、その結果の解釈には細心の注意が必要である。ターゲットキャプチャー法は、外部要因により汚染されたゲノム配列（例えば、作業員や試薬由来の汚染、実験室で増幅したDNA断片由来の汚染など）やサンプル間のクロスコンタミネーション由来のゲノム配列をも濃縮してしまう可能性がある。そのため、本法の利用には、徹底した試薬の管理、作業動線などコンタミネーションのリスクを排除するための工夫が必須である。また、現時点では、メタゲノム解析と比較してターゲットキャプチャー法のコストは高く、ライブラリー調整にはより長い時間と手間がかかるため、大量検体のスクリーニングに使用するには不向きかもしれない。今後、こうした課題を解決し、ターゲットキャプチャー法のような新たな技術がさらに発展し、ヒトの病原体診断だけでなく、ワンヘルスアプローチの一つのツールとして、さらなる新興感染症の脅威への迅速な対応等にも活用されることを期待している。

本研究は、AMEDの課題番号JP22fk0108543及びJSPS科研費JP22K10501の支援を受け、実施したものである。国立感染症研究所感染症危機管理研究センター 影山努 総括研究官には、研究の立案・進め方について有益な議論をいただいた。公立昭和病院小児科・感染管理部 大場邦弘 医師には、臨床検体の採取と臨床医師の立場から解析結果の解釈について示唆をいただいた。また、本稿に関する実験及び条件検討は、感染症危機管理研究センター 久場由真 研究員とともに実施した。この場を借りて皆様に謝意を示したい。

## 参 考 文 献

- [1] Quer J, Colomer-Castell S, Campos C, Andrés C, Piñana M, Cortese MF, González-Sánchez A, García-Cehic D, Ibáñez M, Pumarola T, Rodríguez-Frías F, Antón A, Tabernero D : Next-Generation Sequencing for Confronting Virus Pandemics, *Viruses*, 14 (2022)
- [2] Bassi C, Guerriero P, Pierantoni M, Callegari E, Sabbioni S : Novel Virus Identification through Metagenomics: A Systematic Review, *Life (Basel)*, 12 (2022)
- [3] Ceballos-Garzon A, Comtet-Marre S, Peyret P : Applying targeted gene hybridization capture to viruses with a focus to SARS-CoV-2, *Virus Res*, 340:199293 (2023)
- [4] Lu J, du Plessis L, Liu Z, Hill V, Kang M, Lin H, Sun J, François S, Kraemer MUG, Faria NR, McCrone JT, Peng J, Xiong Q, Yuan R, Zeng L, Zhou P, Liang C, Yi L, Liu J, Xiao J, Hu J, Liu T, Ma W, Li W, Su J, Zheng H, Peng B, Fang S, Su W, Li K, Sun R, Bai R, Tang X, Liang M, Quick J, Song T, Rambaut A, Loman N, Raghwani J, Pybus OG, Ke C : Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China, *Cell*, 181, 997-1003 (2020)
- [5] Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Kawano-Sugaya T, Tanaka R, Yatsu K, Ohnishi A, Goto K, Tsukagoshi H, Ehara H, Sadamasu K, Taira M, Shibata S, Nomoto R, Hiroi S, Toho M, Shimada T, Matsui T, Sunagawa T, Kamiya H, Yahata Y, Yamagishi T, Suzuki M, Wakita T, Kuroda M : A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan, *mSphere*, 5 (2020)
- [6] Ulhuq FR, Barge M, Falconer K, Wild J, Fernandes G, Gallagher A, McGinley S, Sugadol A, Tariq M, Maloney D, Kenicer J, Dewar R, Templeton K, McHugh MP : Analysis of the ARTIC V4 and V4.1 SARS-CoV-2 primers and their impact on the detection of Omicron BA.1 and BA.2 lineage-defining mutations, *Microb Genom*, 9:000991 (2023)
- [7] Fitzpatrick AH, Rupnik A, O'Shea H, Crispie F, Keaveney S, Cotter P : High Throughput Sequencing for the Detection and Characterization of RNA Viruses, *Front Microbiol*, 12:621719 (2021)
- [8] Gaudin M, Desnues C : Hybrid Capture-Based Next Generation Sequencing and Its Application to Human Infectious Diseases, *Front Microbiol*, 9:2924 (2018)
- [9] Wylezich C, Calvelage S, Schlottau K, Ziegler U, Pohlmann A, Höper D, Beer M : Next-generation diagnostics: virus capture facilitates a sensitive viral diagnosis for epizootic and zoonotic pathogens including SARS-CoV-2, *Microbiome*, 9:51 (2021)
- [10] Lwande OW, Thalin T, de Jong J, Sjödin A, Näslund J, Evander M, Ecke F : Alphacoronavirus in a Daubenton's Myotis Bat (*Myotis daubentonii*) in Sweden, *Viruses*, 14:556 (2022)