illumina

廃水サーベイランスによる 新興感染症の追跡

MiSeq[™] i100シリーズを使用した幅広い病原体検出



ライブラリー調製からターゲット濃縮、シーケンスおよびデータ解析までの 包括的なワークフロー



幅広いRNAおよびDNAウイルス病原体の正確な検出と同定



迅速かつ柔軟性の高いシーケンスで、効果的かつ効率的な廃水サーベイランスの 結果を当日中に提供

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

M-GL-02915 v1.0-JPN

はじめに

現代の世界では、感染症による脅威が驚くほど増加しています。グローバル化と国際的な移動により、国境を越えた感染病原体の急速な拡散が進んでいます。¹また、都市化の進行と人口密度の上昇により、感染病原体の伝播にとって理想的な条件が生み出されています。 さらに、バクテリアやウイルスの薬剤耐性株の出現が、感染症の治療と抑制にとって大きな課題となっています。²

廃水サーベイランスは、潜在的な病原体を検出、同定、追跡、特 性解析し、集団の健康を評価するための方法です。³ この方法は、 SARS-CoV-2のゲノムサーベイランスを通じて立証されたように、 感染拡大のモニタリングやコミュニティーレベルでの感染症の脅威 に対する早期警告に役立ちます。⁴ これらの脅威がどこにあるかを知 ることで、地域社会は公衆衛生の対応においてリソースをより適切に 割り当てることができます。PCRに基づく方法は、予想される病原体 の存在の有無についてのスナップショットを迅速にかつ比較的低コス トで提供しますが、モニタリングと検出のための性能は、微生物の配 列の多様性やバリアントを特定する変異に関する既存の知識に左右 されます。次世代シーケンサー (NGS) ワークフローは、時間と費用 面で比較的高価ですが、変異の影響を受けにくく、バリアントの発見 を実現し、病原体の定性的検出だけではなく詳細なゲノム情報を提供 できます。⁵⁻⁷

廃水中のウイルス病原体の正確かつ包括的な検出は、フィルタリング または濃縮技術によるウイルスゲノムの事前の濃縮と、比較的小さな ウイルスゲノムの研究における分析上の課題(最も多く存在するウイ ルスでも、廃水中の総ゲノム物質に占める割合はごくわずか)を克服 するためのNGSライブラリー調製濃縮法の両方に左右されます。⁸⁻¹⁰ また、濃縮によりライブラリーにおける目的のゲノムの含量を相対 的に増加させることで、ベンチトップ装置でのシーケンスも可能にし ます。

このアプリケーションノートでは、Illumina Viral Surveillance Panel v2、MiSeq i100シリーズおよび装置内蔵DRAGEN[™] 二次解 析を統合したNGSワークフローを使用した、実際の廃水サンプル中 のウイルス病原体の検出と同定について説明します(図1)。MiSeq i100 Plusシステムは、効率的な廃水サーベイランスの結果をその日 中に提供し、迅速な公衆衛生の対応を実現します。



方法

サンプル

未処理の廃水サンプルは、Wisconsin State Laboratory of Hygiene (WSLH) により廃水処理工場から (12サンプル)、およ びColorado State University (CSU) により学生寮から (12サ ンプル) 採取されました (両施設とも米国の施設です)。サンプル は2022年11月4日から2022年12月16日の間の複数の時点で各施 設から採取されました。10~50 mLのサンプル廃水は、Nanotrap Microbiome A Particles (Ceres Nanosciences, Inc.、カタ ログ番号: 44202) を用いたウイルス捕捉と濃縮によってWSLH が調製しました。核酸はWizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega Corporation、カタログ番号: A2991) を使用して 抽出しました。CSUが調製したサンプルは約2,000 × gで遠心分 離して固形物を除去した後、CP Select Concentrating Pipette (InnovaPrep, Inc.) を使用してウイルス捕捉と濃縮を行いまし た。核酸はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN、カタログ番 号: 52904) を使用して抽出しました。

ライブラリー調製

シーケンス用ライブラリーは、Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set A (96 samples) (イルミナ、カタログ番号:20108081) を使 用して最大インプット量8.5 µl (抽出した総核酸 (TNA) 100 ng以 上) から調製しました。ライブラリーは各6ライブラリー (6プレック ス) から成る4つのプールに統合し、シーケンスのローディング濃度 は80 pMとしました。

シーケンス

調製したライブラリーはMiSeq i100 Plusシステムで、150 bp × 2 のラン構成で25Mフローセルを使用してシーケンスしました。より 大規模な研究の場合、シーケンスランをNextSeq[™] 1000システ ム、NextSeq 2000システム、NovaSeq[™] 6000システムおよび NovaSeq Xシステムでスケールアップすることができます。

データ解析

シーケンス完了後、FASTQ Toolkit Appを使用して、データをサン プルあたり100万クラスターと400万クラスター/断片にダウンサン プリングしました。ダウンサンプリングしたデータとしていないデー タは、MiSeq i100 Plusシステムに搭載されたDRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME+) アプリを使って解析しました。このアプ リは、BaseSpace[™] Sequence Hubのクラウドからアクセスする ことも可能です。

結果

シーケンスメトリクス

4つの廃水プールをMiSeq i100 Plusシステムで4回のランでシーケンスしました。4回すべてのランで平均してQ30の割合が90%以上、リードパスフィルター (PF)の割合が約80%となったことから、高品質なリードと一貫性のある装置ローディング濃度の両方が示されました。得られたペアエンド (PE)リードの総数はフローセルの仕様である5,000万を超えています。4回のランすべてについて、装置ランタイムとオンボードの解析時間は合計で8時間未満でした(表1)。このことは、MiSeq i100 Plusシステムが、公衆衛生のモニタリングと対応において重要な、タイムリーな結果の提供に必要なスピードと効率を実現していることを示しています。

表1:MiSeq i100シリーズのシーケンスメトリクス								
MiSeq i100 Plusシステムラン	平均 % Q30	% PF	ペアエンドリード総数	ペアエンドリードPF総数	ランタイム	オンボードの 解析時間		
ラン1 (CSU)	93.65%	78.49%	79,073,280	62,064,116	7時間11分	18分		
ラン2 (CSU)	93.35%	78.06%	79,073,280	61,723,176	7時間12分	17分		
ラン3 (WSLH)	94.57%	81.62%	79,073,280	64,539,830	7時間12分	19分		
ラン4 (WSLH)	94.38%	81.43%	79,073,280	64,389,944	7時間12分	19分		

ウイルスゲノムの検出

効果的な病原体検出に必要なシーケンス深度の確立と比較に役立 てるために、さまざまな深度でリードの解析をシミュレーションしま した。さらに、検出されたウイルスゲノムの長さが大きく異なること から、正確な定量にはデータノーマライゼーションが必要でした。そ のため、カバーしたゲノムの一部を、4つの廃水サンプルライブラリー プール全体にわたってlog10 RPKM (Reads Per Kilobase per Million、100万リードあたりの1キロベースあたりのリード数)のリー ドに対してプロットし、100万断片にダウンサンプリング、400万断 片にダウンサンプリング、全深度(ダウンサンプリング、400万断 片にダウンサンプリング、全深度(ダウンサンプリングなしまたはサ ンプルあたり約500万断片)の3つのシーケンス深度でシミュレー ションしました。RPKMは、カバレッジ深度とターゲット領域の長 さを組み合わせてNGSデータをノーマライズする、一般的な手法で す。これにより、異なる病原体間だけではなく、同じ病原体の経時的 変化のより精度の高い比較が可能となります。検出されたウイルスの カバレッジを、検出 (5~20%)、サーベイランス (20~60%) および 全ゲノムカバレッジ (60~100%)の大まかな3つの範囲に分類しま した(図2)。最も低い範囲のウイルス病原体は確実に検出されまし たが、ウイルス進化や正確なバリアント情報の追跡にはカバレッジが 不足していました。中間の範囲のウイルスゲノムは、分子の効果的な 同定と経時的なウイルス濃度の変化の検出に十分なカバレッジがあ りました。最も高い範囲で検出されたゲノムは、バリアント特定によ る特性解析が可能でした。ウイルスゲノムの総数はリード深度の増加 に従って増加しますが、400万クラスター/断片 (800万PEリード)付 近でプラトーに達しました (図2および表2)。



表 2:施設別に検出されたウイルスゲノムの総数								
施設	ゲルカ	シーケンス深度						
	バレッジ	100万 リード	400万 リード	全深度				
CSU	5–20%	65	94	97				
	20-60%	45	53	54				
	60–100%	34	40	92				
WSLH	5–20%	46	60	64				
	20-60%	54	39	38				
	60–100%	73	100	102				

図3:廃水サンプル中のウイルス存在量のヒートマップ

ウイルスゲノムの同定

縦断研究の一環として、検出されたウイルスゲノムをlog10 RPKM値 を昇順に並べてヒートマップにプロットしたところ、さまざまな採取 施設で経時的に検出された消化器系および呼吸器系ウイルスの濃度 の違いが、相対存在量(図3)とゲノムカバレッジ(図4)によって示さ れました。経時的なゲノムカバレッジのプロットでは、12月時点での コクサッキーウイルスA/B、ノロウイルス、ママストロウイルス(ヒト アストロウイルス)、サリウイルス(図4)など、消化器系ウイルスの増 加が示され、ヒト便中に排出されたこれらの病原体ウイルスとその他 の病原体ウイルスが大量に検出されたというこれまでの報告と一致 していました。¹¹

CSUおよびWSLHサンプルから検出されたウイルスゲノムのlog10 RPKM値を昇順に並べています。このヒートマップは、消化器系および呼吸器系分類に対応 するウイルスを示しています。WSLHサンプル (145個) はCSUサンプル (63個) と比較してウイルスゲノム検出数が多くなりました。処理工場からのサンプルと 比較して、寮の廃水サンプルに関わるヒトの数が相対的に少ないため、検出された病原体の数が少なくなっています。各採取施設の上に11月 (N) と12月 (D) の 採取日が示されています。

5

同様に、呼吸器系ウイルスのボカウイルスおよびライノウイルスA/ Cについても、12月に採取されたサンプルにおいて濃度の増加が 示されました(図4)。これらのデータは、冬の初旬の呼吸器系病 原体の伝搬において歴史的に観察される季節性の増加と一致して おり、感謝祭の休暇を利用した移動により感染が拡大すると考え られます。¹²

まとめ

MiSeq i100シリーズは迅速かつ包括的なNGSワークフローの一部 であり、公衆衛生の取り組みの一環としての効果的な廃水サーベイ ランスのためのウイルス病原体の広範囲な検出を実現します。

詳細はこちら 🔶

Viral Surveillance Panel v2 MiSeq i100シリーズ DRAGEN二次解析

参考文献

- CDC. Disease Patterns in Travelers. cdc.gov/travel/ yellowbook/2024/introduction/disease-patterns-in-travelers. Updated May 1, 2023. Accessed February 5, 2025.
- Reyes R, Ahn R, Thurber K, Burke TF. Urbanization and Infectious Diseases: General Principles, Historical Perspectives, and Contemporary Challenges. *Challenges in Infectious Diseases*. 2012;123-146. Published 2012 May 19. doi:10.1007/978-1-4614-4496-1_4.
- CDC. Wastewater Monitoring—How Does It Work? cdc.gov/ nwss/pdf/Wastewater-COVID-infographic-h.pdf. Accessed January 24, 2025.
- Gupta P, Liao S, Ezekiel M, et al. Wastewater Genomic Surveillance Captures Early Detection of Omicron in Utah. Microbiol Spectr. 2023;11(3):e0039123. doi:10.1128/ spectrum.00391-23.
- US GAO. Science & Tech Spotlight: Wastewater Surveillance. gao.gov/products/gao-22-105841. Published April 11, 2022. Accessed January 24, 2025.
- Diamond MB, Keshaviah A, Bento AI, et al. Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses. Nat Med. 2022; 28(10):1992-1995. doi:10.1038/s41591-022-01940-x
- Crits-Christoph A, Kantor RS, Olm MR, et al. Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants. *mBio*. 2021;12(1):e02703-20. Published 2021 Jan 19. doi:10.1128/mBio.02703-20.
- Dueholm MKD, Nierychlo M, Andersen KS, et al. MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nat Commun.* 2022;13(1):1908. Published 2022 Apr 7. doi:10.1038/s41467-022-29438-7.
- 9. Kantor RS, Jiang M. Considerations and Opportunities for Probe Capture Enrichment Sequencing of Emerging Viruses from Wastewater. *Environ Sci Technol.* 2024;58(19):8161-8168. doi:10.1021/acs.est.4c02638.
- Cancela F, Lizasoain A, Panzera Y, et al. Targeted Enrichment Sequencing Utilizing a Respiratory Pathogen Panel for Genomic Wastewater-Based Viral Epidemiology in Uruguay. *Food Environ Virol.* 2025;17(1):14. Published 2025 Jan 9. doi:10.1007/s12560-024-09629-9.
- Tisza M, Javornik Cregeen S, Avadhanula V, et al. Wastewater sequencing reveals community and variant dynamics of the collective human virome. *Nat Commun.* 2023;14(1):6878. Published 2023 Oct 28. doi:10.1038/s41467-023-42064-1.
- CDC. Respiratory Illnesses Data Channel. cdc.gov/respiratoryviruses/data/index.html#cdc_data_surveillance_section_2weekly-national-summary. Updated February 21, 2025. Accessed February 25, 2025.

販売店

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階 Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810 jp.illumina.com

f www.facebook.com/illuminakk

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件:jp.illumina.com/tc © 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.htmlをご覧ください。 予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。 <u>illumına</u>

