

Viral Surveillance Panel

ハイブリッドキャプチャー濃縮を用いた
高リスクのウイルスに対する
効率的な全ゲノムシーケンス

- 公衆衛生上リスクが高いとされている66ウイルスを網羅
- RNAとDNAウイルス病原体に対するターゲット濃縮
- 幅広い種類の宿主サンプルと環境サンプルに対応

illumina®

公衆衛生に対するウイルスの脅威をモニタリング

2019年の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)および2022年のサル痘ウイルスの感染拡大より、感染拡大をモニタリングし評価するための病原体早期警告システムとツールの緊急の必要性が明らかになりました。次世代シーケンサー(NGS)は、感染性因子に対する事前の情報を必要とすることなく、サンプルをスクリーニングし、ウイルスを検出するための効果的なアプローチを提供します。NGSから提供される詳細な情報により、以下を含む重要な特性評価やモニタリングアプリケーションが実現します:

- 感染拡大中の既知の陽性サンプルの反射的シーケンス
- 感染源と伝播経路の追跡
- ウイルス進化と抗ウイルス薬抵抗性に対するモニタリング

Viral Surveillance Panelは66のウイルスゲノムをNGSで検出することが可能であり、世界保健機関(WHO)で公衆衛生上重要なリスクとして同定されているウイルスも含まれます(表 1)。¹ 本パネルはハイブリッドキャプチャーターゲット濃縮ワークフローを使用し、ショットガンメタゲノミクスシーケンスで必要とされる高いリード深度を必要とすることなく、さまざまな種類のサンプルのシーケンスが可能です。アンプリコンシーケンスなどのその他のターゲットリシーケンスメソッドと比較すると、ハイブリッドキャプチャー法はゲノム全体のより均一なカバレッジ、より広範囲なターゲットに対するプローブパネル、変異や関連配列を同定するための高い能力を提供するため、感染拡大のサーベイランスにViral Surveillance Panelが適しています。

統合型の包括的なNGSワークフロー

Viral Surveillance Panelワークフローは、宿主サンプルや下水を含む環境サンプルなど幅広いタイプのサンプルからウイルスゲノムを濃縮します。² ライブラリー調製からシーケンスのステップは、ベンチトップシーケンサーを使用する場合、2日で完了します(図 1)。

表1:Viral Surveillance Panelに含まれるウイルス¹

アデノウイルス	B型肝炎ウイルス	パレコウイルス
アイチウイルス	C型肝炎ウイルス	パルボウイルス
アストロウイルス	E型肝炎ウイルス	ポリオウイルス
チャパレウイルス	ヒト免疫不全ウイルス1型	ポリオマウイルス
チクングニアウイルス	ヒト免疫不全ウイルス2型	呼吸器合胞体ウイルス(RSウイルス)
コロナウイルス-229E	A型インフルエンザウイルス	ライノウイルス
コロナウイルス-HKU1	B型インフルエンザウイルス	リフトバレー熱
コロナウイルス-OC43	日本脳炎ウイルス	ロタウイルス
コロナウイルス-NL63	フニンウイルス	風疹ウイルス
コクサッキーウイルス	キャサナル森林病ウイルス	サビアウイルス
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	ラッサ熱ウイルス	サリウイルス
デングウイルス1型	ルジョ出血熱ウイルス	サポウイルス
デングウイルス2型	マチュポウイルス	SARS-COV
デングウイルス3型	マールブルグウイルス	SARS-COV-2
デングウイルス4型	MERS-CoV	ダニ媒介性脳炎ウイルス
東部ウマ脳炎ウイルス	メタニューモウイルス	トルクテノウイルス
エボラウイルス	サル痘ウイルス	天然痘ウイルス
エンテロウイルス	ニパウイルス	ベネズエラ馬脳炎ウイルス
グアナリトウイルス	ノロウイルス	ウエストナイルウイルス
ハンタウイルス	オムスク出血熱ウイルス	西部ウマ脳炎ウイルス
ヘンドラヘニバウイルス	腫瘍溶解性ヒトパピローマウイルス	黄熱ウイルス
A型肝炎ウイルス	パラインフルエンザウイルス	ジカウイルス

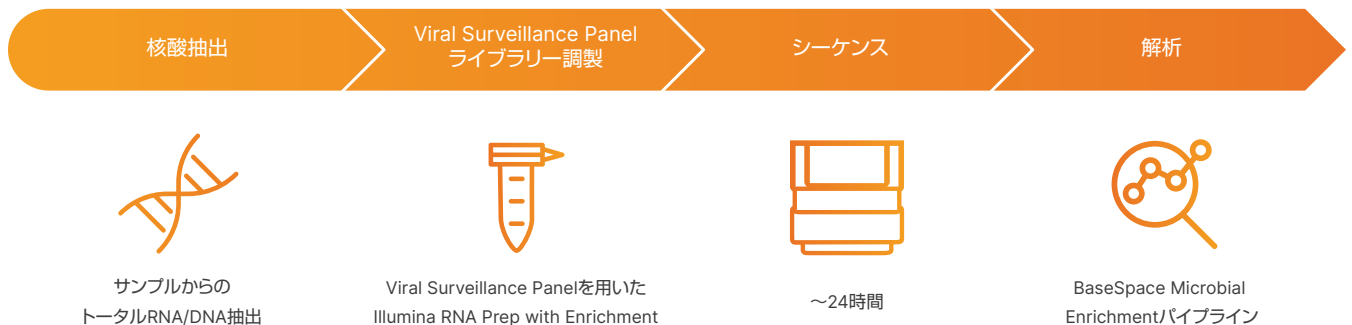


図1: Viral Surveillance Panelワークフロー: 効率的かつ包括的なワークフローは、ライブラリーを環境または宿主サンプルから調製し、どのイルミナのシーケンスシステムでもシーケンスを実施できます。BaseSpace Microbial Enrichment/パイプラインではウイルス検出、全ゲノムのコンセンサスを生成し、最も一致性の高いウイルスに対してリードマッピングおよび株のタイピング解析を実施します。シーケンス時間はサンプルリード深度および使用するシーケンスシステムによって異なります。

ライブラリー調製

Viral Surveillance Panelのライブラリー調製には、イルミナの [Respiratory Virus Oligo Panel](#) と同一のプロトコルを用います。³ Illumina RNA Prep with Enrichmentは、ビーズ上のタグメンテーションを実施の後に、1回のみハイブリダイゼーションステップを要する、濃縮ライブラリーを生成するための迅速なワークフローを提供します。Illumina RNA Prep with Enrichmentは下記の特徴を有します:

- 迅速かつ自動化対応ワークフローにより、最短のハンズオンタイムで、約2日で完了
- 10 ng~100 ngの核酸に対応したサンプルインプット量に対する柔軟性
- スケーラブルなスルーputにより、1回のランで最大384サンプルのマルチプレックスに対応

シーケンス

VSP濃縮ライブラリーのシーケンスに必要なリード深度は低いため、ベンチトップ型のMiniSeq[™] システム、MiSeq[™] システム、NextSeq[™] 550システム、NextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システムを含む複数のシーケンスシステムを選択できます。ウイルスカバレッジ、核酸サンプル品質、サンプルリード深度およびサンプルあたりのリード数は、ウイルスに特異的なリード数と取得するシーケンスカバレッジに影響します。品質の良いサンプルに対する一般的なシーケンスリード深度の推奨値は、サンプルあたり最少200万ペアエンドリード、リード長149 bpです。また、推奨されるサンプルリード深度はサンプルの種類によっても変化します。下水などのより複雑なサンプルについては、サンプルあたり最少400万のペアエンドリードが推奨されます。

データ解析

Viral Surveillance Panelは[BaseSpace[™] Sequence Hub](#)上で利用できる、Microbial Enrichment二次解析パイプラインに対応します。Microbial Enrichmentパイプラインは、コンティグアセンブリ、コンセンサス配列、パネルに含まれるウイルスゲノムに対するゲノムカバレッジを提供します。

性能

ターゲット濃縮

Viral Surveillance Panelのハイブリッドキャプチャーターゲット濃縮は、Illumina RNA Prep with Enrichmentキットを用いて実施します。すべてのRNA/DNAをシーケンシングするショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較すると、ターゲットハイブリッドキャプチャーは宿主と非ターゲット微生物由来の不要なシーケンスを減らすことで、コストを削減し、ベンチトップ型のシーケンサーを用いた幅広いウイルスゲノムのシーケンスを実現します(図2)。

一度に複数のウイルスの全ゲノムシーケンス(WGS)を実施することで、ウイルスサーベイランスとウイルス進化の解析が可能になります。Viral Surveillance Panelにおけるターゲット濃縮プロローブはウイルスゲノム全体の均一なカバレッジを提供します(図3)。また、ハイブリッドキャプチャープロトコルに使用するオリゴプロローブは、変異領域に対しても有効であるため、RNAウイルスなどの急速に進化するウイルスの捕捉も可能です。

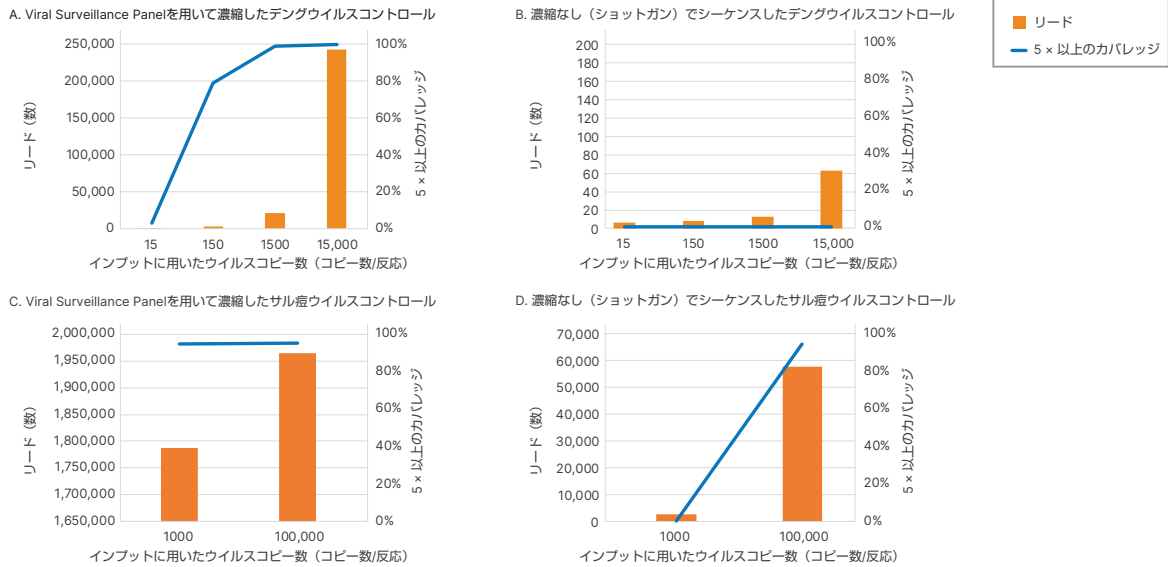


図2: Viral Surveillance Panelを用いたリード数およびウイルスゲノムカバレッジの取得: 市販で購入可能なウイルスコントロールを用いたViral Surveillance Panelと濃縮なしシーケンスの性能比較。(A) デングウイルスコントロールを10 ngのヒトRNAバックグラウンドに混合し、Viral Surveillance Panelで濃縮。(B) デングウイルスコントロールを10 ngのヒトRNAバックグラウンドに混合し濃縮なしでシーケンス。(C) サル痘ウイルスコントロールを10 ngのヒトRNAおよび10 ngのヒトDNAバックグラウンドに混合し、Viral Surveillance Panelで濃縮。(D) サル痘ウイルスコントロールを10 ngのヒトRNAおよび10 ngのヒトDNAバックグラウンドに混合して濃縮なしでシーケンス。サンプルをシーケンスし、データは149 bp × 2の200万ペアエンドリードにノーマライズしました。

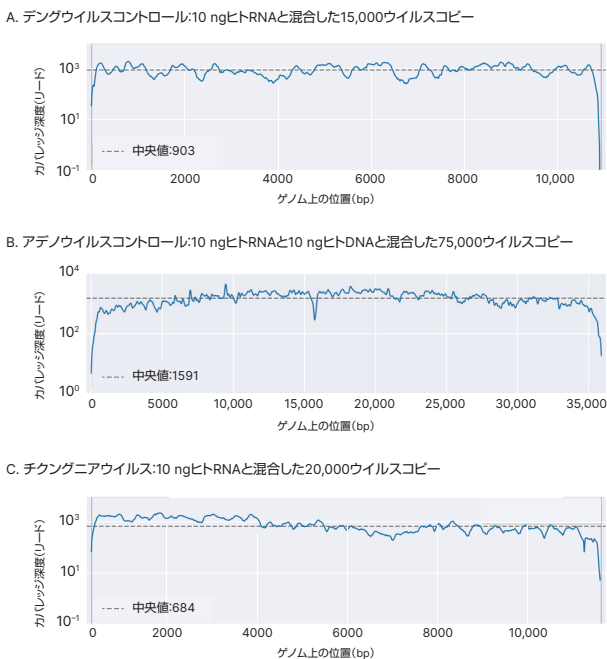


図3: Viral Surveillance Panelを用いた濃縮後の均一なウイルスゲノム: 既知のコピー数のウイルスコントロールを10 ngのヒトRNA/DNAミックスと混合してウイルスコントロールを調製しました。ライブラリー調整およびシーケンスはViral Surveillance Panelワークフローを用いて実施しました。

下水サーベイランス

下水中のウイルスシーケンスのサーベイランスは、ウイルス性病原体の地域での拡大に関する局地的指標を提供し、公衆衛生の専門家が対応計画を検討するための価値ある情報を与えることができます。Viral Surveillance Panelはこれらのサンプルを用いて、ショットガンシーケンスよりも低濃度で下水中のウイルスゲノムの早期検出と同定を可能にします(表2)。

まとめ

Viral Surveillance Panelはウイルス感染拡大の検出とモニタリングのために最適化された完全なワークフローを提供します。このパネルには、公衆衛生上高リスクであると同定されている66のRNA/DNAウイルスの全ゲノムに対するハイブリッドキャプチャープローブが含まれています。¹ ハイブリッドキャプチャーターゲット濃縮により、高いサンプルリード深度を必要としない、ターゲット配列に集中した解析が可能になります。これにより、コストを削減しスループットの性能が向上します。ワークフローは、幅広いサンプルの種類とアプリケーションにも対応しており、ウイルスの地域的な存在を調べるための下水サーベイランスも含まれます。最後に、Viral Surveillance Panelの解析にはBaseSpace

表2:Viral Surveillance Panelまたはショットガンシーケンスを用いて下水中に検出されたウイルス^a

	Viral Surveillance Panel	ショットガン シーケンス	Viral Surveillance Panel	ショットガン シーケンス
同定されたウイルス	5 × 以上のカバレッジのゲノム領域(%)		リード(数)	
アストロウイルス	98.9	0	122525	7
JCポリオーマウイルス	98.9	0	29749	0
BKポリオーマウイルス	97.8	0	29318	5
hCoV-OC43	87.3	0	23352	8
アイチウイルスA	95.1	0	16919	4
ノロウイルスGII	90.0	0	7873	0
コクサッキーウイルスA19	65.2	0	7195	0
ノロウイルスGII.P7.GII.6	69.7	0	2572	0
ノーウォーク様ウイルス	57.3	0	1191	0
ノロウイルスGI株	51.2	0	859	0

a. サンプルはコロラド州立大学の研究者によって収集され、精製されたトータル核酸は試験のためにイルミナに配送されました。ライブラリーは100 ngのトータル核酸を使用して調製し、シーケンスしました。

Sequence Hub上の無料のMicrobial Enrichment Analysisパイプラインを使用できます。このNGSワークフローは、高価で複雑なショットガンシーケンスに代わる高度な手段を公衆衛生の組織や研究者に提供します。

詳細はこちら

Viral Surveillance Panel: jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/viral-surveillance-panel.html

Illumina RNA Prep with Enrichment: jp.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html

BaseSpaceアプリケーション: jp.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps.html

イルミナシーケンスプラットフォーム: jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html

製品情報

製品名	カタログ番号
Viral Surveillance Panel (96 samples)	20088154
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set A (96 samples)	20087932
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set B (96 samples)	20087929

参考文献

1. Bloom DE, Cadarette D. [Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response](#). *Front Immunol*. 2019;10:549. Published 2019 Mar 28. doi:10.3389/fimmu.2019.00549
2. McClary-Gutierrez JS, Aanderud ZT, Al-Faliti M, et al. [Standardizing data reporting in the research community to enhance the utility of open data for SARS-CoV-2 wastewater surveillance](#). *Environ Sci (Camb)*. 2021;9:10.1039/d1ew00235j. doi:10.1039/d1ew00235j
3. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation: Reference guide. jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/translations/illumina-rna-prep-reference-guide-1000000124435-jpn.pdf. Published 2021. Accessed September 13, 2022.

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

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

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

© 2022 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。

Pub. No. M-GL-01240 v1.0-JPN 22NOV2022

illumina®