

## 次世代シーケンサーの応用について

### 1 次世代シーケンサーについて

次世代シーケンサー（以下「NGS」という。）とは、従来の塩基配列解析法（サンガー法等）より格段に多いデータ量が得られる塩基配列解析装置です。当所では疑似症の網羅的な病原体検索や新型コロナウイルスのゲノム解析を目的とし令和2年度から使用しています。

当所に導入されたものは、イルミナ社の Sequence-By-Synthesis 法を採用したもので、いわゆる第二世代と言われている機器です。その原理は、DNA を短い断片に切断した後、アダプターと呼ばれる特異的な配列を持つ DNA 断片を結合させます。その1分子のDNAを微小空間内でPCR反応により増幅させ、並列的に反応を行い、塩基配列を同時に読み取ることで大容量のデータを得ることができます。

NGS の特徴の一つとして、遺伝子の同一部分について複数回読み取ることで厚みがある情報が得られるということがあります。そのため、わずかな変異も検出できる可能性があることから、新型コロナウイルスのゲノム解析に用いられています。

また、通常のPCR等と異なり、病原体に特異的なプライマーセットを使用せず、サンプル内に存在する全てのDNAが解析対象となることから、網羅的に病原体を検出することが可能です。このことを利用して、原因不明感染症の起病因原体の網羅的解析に活用できることが期待されています。

### 2 新型コロナウイルスのゲノム解析

NGS を用いた新型コロナウイルスのゲノム解析は令和2年11月から開始し、令和5年3月まで19,098検体のゲノム解析を行いました。NGS から得られたデータは、国立感染症研究所が開発した SARS-CoV-2 ゲノム解析のための Web アプリケーションを用いて解析し、遺伝子型を決定しています。決定した塩基配列は COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan で解析した後、Global Initiative on Sharing All Influenza Data に登録し世界中の研究者と共有されています。

また、集団発生事例が生じた場合、ゲノム解析結果から

ハプロタイプネットワーク図（図1）を作成し、保健所が取得した疫学情報と合わせて解析を行いました。解析結果は定期的に開催していた保健所との研修会等で共有され、感染経路の究明等に活用することができました。

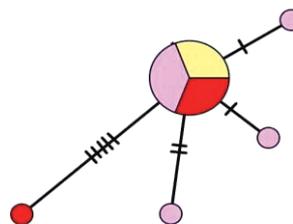


図1. ハプロタイプネットワーク図

### 3 原因不明感染症等の起病因原体の網羅的探索

当所では感染症発生动向調査や行政依頼検査などの事業で様々な検体が搬入され、主にPCRを中心とした遺伝子検査を行っています。通常、遺伝子検査は目的とする病原体をピンポイントに検出する検査法です。しかし、中には明確に症状があるにも関わらず検査を行っても陰性となり、起病因原体不明となる検体が多くあります。検査陰性となる理由としては、当所の既存の検査法では検出できない病原体である可能性や、新型あるいは変異型の病原体の出現による検出感度の低下などが考えられます。これらの問題を解決するためにNGSを活用した網羅的な病原体検索が行われております（図2）。当所でもターゲットキャプチャー法やRNAシーケンスの検討を行い、今後、疑似症や原因不明の感染症に対して活用していきたいと考えています。

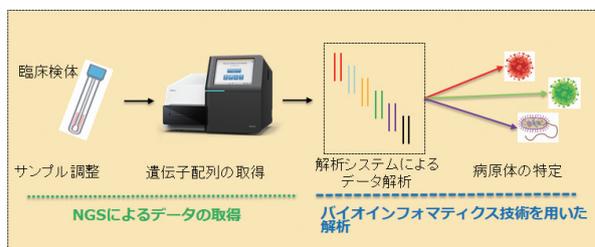


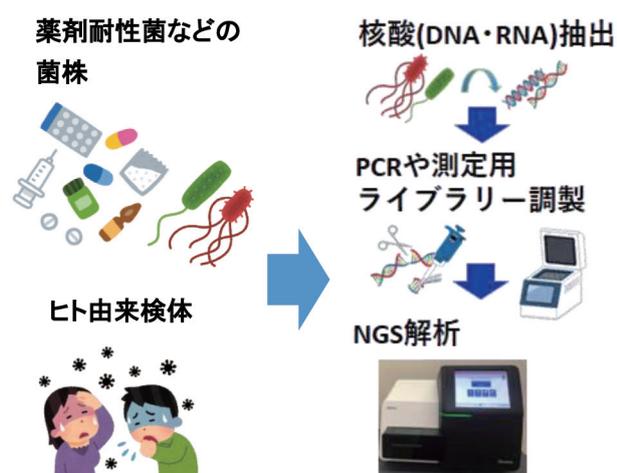
図2. 原因不明感染症等の起病因原体の網羅的探索

#### 4 薬剤耐性菌が保有する薬剤耐性遺伝子の網羅的検出

薬剤耐性菌とは、治療に使用する特定の種類の抗菌薬が効きにくい、または効かなくなった細菌のことを言います。特に問題となっているのは、複数の抗菌薬に耐性を示す「多剤耐性菌」や、最後の切り札として使用されるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す「カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）」の拡大です。

当所では感染症発生動向調査事業の中で、CRE 感染症として届出された薬剤耐性菌の検査を実施しています。また、ワンヘルス薬剤耐性菌調査事業の中で、愛玩動物（犬、猫）の薬剤耐性菌保有状況の調査や水環境中の薬剤耐性菌の汚染実態調査を実施しています。さらに NGS 等の最新技術を用いて、薬剤耐性菌が保有する薬剤耐性遺伝子の網羅的な検出等を行い、薬剤耐性菌の詳細な性状や特徴を明らかにします。県内の薬剤耐性菌がどのような薬剤耐性遺伝子を保有しているのか、またどのようなプラスミドによって薬剤耐性遺伝子が広がっているのかを解析していきます。

NGS による解析手法は様々ですが、一般的には検体や菌株から DNA を抽出し、抽出した DNA を NGS の測定に適した状態にするライブラリー調製を行います。その後、調製したライブラリーを試薬、フローセルと共に NGS の装置にセットして 24~72 時間程度測定を行います。実験の実施計画を立ててからここまででトータルで約 5~7 日間程度必要です（図 3 (A)）。

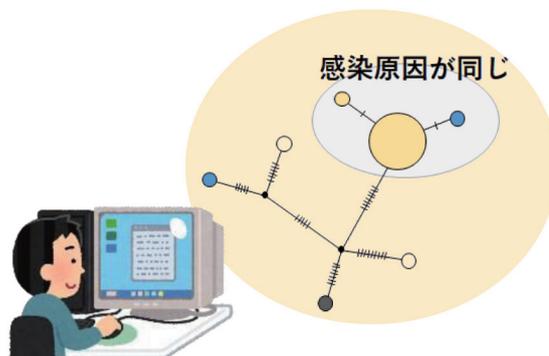


(A) 次世代シーケンサー(NGS)による細菌ゲノム配列の取得

NGS によって得られた配列は、クオリティの確認、アセンブル等を行い、ゲノム配列を得ます。これらの配列から、ResFinder 等の公開されている網羅的な耐性遺伝子のデータベースを用いて薬剤耐性遺伝子の検索を行います。このデータ解析の作業にも約 3~4 日間程度を要します。解読するゲノムサイズが大きい程、CPU やメモリ等のスペックが高いパソコン解析環境が必要となってきます。また、得られた大量のデータをパソコンで解析する技術はバイオインフォマティクス(BI)と呼ばれており、微生物学や生物学等の知識だけでなく、Linux の専門知識やプログラミングの技術等、高度なスキルを持った人材が必要です。

#### 5 その他の細菌ゲノム解析

NGS を用いて得られた遺伝子情報を解析することによって、薬剤耐性遺伝子だけでなく、細菌の菌種や保有するプラスミドタイプ、病原遺伝子等がわかります。そのため、人獣共通感染症等の感染症や食中毒の原因となる細菌等、様々な細菌ゲノム解析への応用が期待できます。例えば全ゲノム配列を比較解析することで、菌株間に関連があるか、感染原因が同じであるか等を推定することができます（図 3 (B)）。細菌ゲノムは、ウイルスゲノムよりも遺伝子情報が非常に多いため、取り扱うデータ量が大きくなります（例えば新型コロナウイルスは約 3 万個という塩基数に対して、大腸菌は約 500 万個という塩基数です）。そのため、解析手順も異なり、必要なパソコンのスペックも高くなります。今後、さらにデータベースやソフトウェア等の発展により、細菌ゲノム解析の技術も進歩すると考えられ、NGS の活用がより幅広くなることが期待されます。



(B) バイオインフォマティクス技術(BI)による細菌ゲノムのデータ解析

図3 薬剤耐性菌等の細菌ゲノムの次世代シーケンサー(NGS)解析

## 廃棄物の循環利用に関する研究について

### 1 はじめに

令和5年3月30日に環境省から発表された「一般廃棄物の排出及び処理状況等（令和3年度）について」によると、現存する最終処分場（埋立処分場）が満杯になるまでの残り期間の推計値である残余年数は23.5年と逼迫しており、3Rの推進は県内の生活環境の保全と産業の健全な発展を図る上で、極めて重要な課題となっています。

これまで企業で3Rが取り組まれてきましたが、いまだ有用な資源が利用されず廃棄されている現状があります。更なるリサイクルを進めるには、機能性・安全性を評価できる分析機関が参画した資源循環利用の研究が有効です。そこで、当研究所は、企業・大学等と連携を図り、廃棄物の資源循環利用促進の課題解決に向けて研究を行っています。

ここでは、2つの研究テーマについて紹介します。

#### 2-1 バイオマス発電所焼却灰有効利用プロジェクト

本プロジェクトは、研究代表者が九電みらいエナジー（株）、共同研究者が濱田重工（株）、宮若STM石灰（株）、福岡県農林業総合試験場、福岡県工業技術センター及び福岡県保健環境研究所であり、公益財団法人福岡県リサイクル総合研究事業化センターの共同研究プロジェクトに採択されました。

令和4年4月時点で、福岡県では6か所の木質バイオマス発電が運転及び建設中であり、370MWの発電が見込まれ、年間約8.2万トンの焼却灰が発生すると推測されています。一般的に、

バイオマス発電の焼却灰は大半が産業廃棄物として最終処分場で処理されており、福岡県においても最終処分場を圧迫することが懸念されます。

また、福岡県では養鶏が盛んであり、「はかた地どり」及び「はかた一番どり」等のブランド化に取り組んでいます。一般的に、養鶏事業者は、養鶏時の鶏糞の処理に苦慮しており、処分費を払って産業廃棄物として処分しています。福岡県内だけでも年間約1万トンの鶏糞が発生していると推定され、養鶏事業者の大きな負担となっています。

バイオマス発電の焼却灰には肥料三大栄養素であるカリウムが含まれています。しかし、その一方で、六価クロム及びセレン等の有害成分が含まれています。また、鶏糞にはカリウム以外の肥料三大栄養素である窒素及びリンが含まれています。そこで、本共同研究では、上記焼却灰と鶏糞の二つの廃棄物を活用しつつ有害成分を無害化し、三大栄養素を含んだ混合特殊肥料として自然に還すことで資源循環サイクルの実現を目指しました（図1）。

本プロジェクトでは、次の課題①～④について検討しました。①無害化技術の確立、②試作品製造試験、③肥料を用いた野菜の生育試験、④国内外における販売先の確保等。

当研究所は、課題①について、焼却灰や製品等に含まれる鉛、六価クロム、砒素、セレン、ふっ素、ほう素及びカドミウム等の有害成分を分析し、混合特殊肥料の安全性を評価しました。その結果、含有量試験では土壌汚染対策法の土壌含有基準以下、溶出

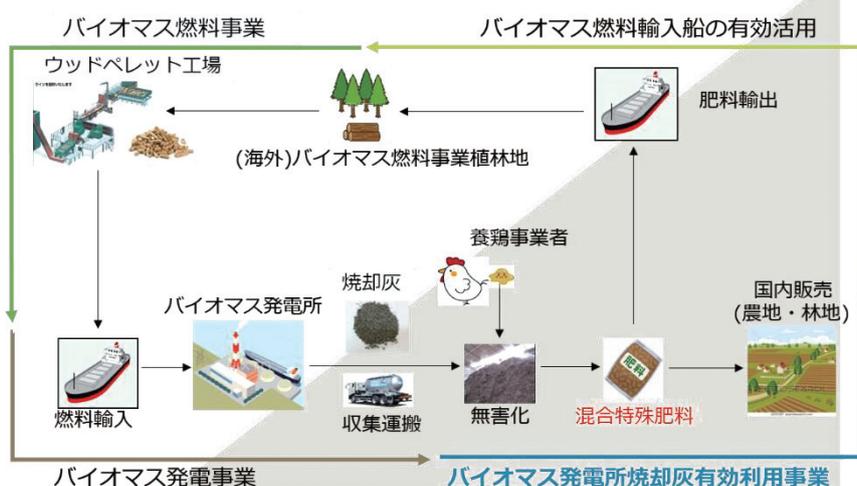


図1 バイオマス発電所焼却灰有効利用プロジェクトにおける循環サイクル

量試験ではフィールド試験において土壌汚染に係る環境基準以下であり、混合特殊肥料の安全性を確認することができました。

## 2-2 廃棄キノコ抽出物による植物由来フリーセラミドの製造プロジェクト

本プロジェクトは、研究代表者が（株）ジェヌインR&D（以下、ジェヌイン）、共同研究者が福岡県醤油醸造協同組合、京都大学、福岡県保健環境研究所であり、公益財団法人福岡県リサイクル総合研究事業化センターの共同研究プロジェクトに採択されました。

令和元年度、福岡県のキノコ生産量は約2.6万トンであり、全国3位のキノコを生産量を誇っています。そのうち約1割が石づき部分や規格外品として廃棄されていると言われており、生産者は処分費を払って産業廃棄物として処分しています。

ジェヌインは、キノコが自己消化液によってフリーセラミドを生成すること及び自己消化液中に糖セラミドを分解する酵素が存在することを発見し、それに関する特許を保有しています。

本共同研究では、福岡県内の廃棄キノコ、フルーツの絞り粕及び野菜の加工残渣等の植物系食物残渣に着目し、次の課題①～③について検討しました。①廃棄キノコから分解酵素エキスの抽出、②分解酵素エキスの植物系食物残渣への適用、③植物由来フリーセラミドを用いた食品、サプリメント及び化粧品等の商品化及びブランド化（図2）。

図3に示すように、フリーセラミドはスフィンゴイド塩基と脂肪酸で構成されており、スフィンゴイド塩基や脂肪酸のアルキル鎖の長さ、水酸基の数及び不飽和結合の数の違いにより多くの種類が存在し、約350種類が確認されています。しかし、市

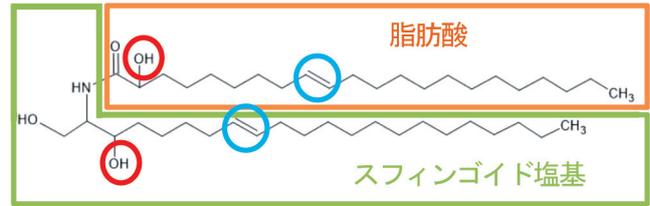


図3 フリーセラミドの構造例

販されているフリーセラミド標準物質は、5、6種類と非常に少なく、定性分析が課題でした。

当研究所は、課題②で作成した植物由来のフリーセラミドについて、液体クロマトグラフトンデム質量分析装置を用いて定性する方法を検討しました。その結果、フリーセラミドを構成する脂肪酸のアルキル鎖が長くなるほど保持時間が遅く、また、水酸基及び不飽和結合を多く持つほど保持時間が早まる傾向にありました。そこで、液体クロマトグラフィー部分の分析条件を工夫することで、標準物質との保持時間の差から未知のフリーセラミドについて定性ができるようになりました。

### 3 まとめ

当研究所は、2つの共同研究において、高精度で高感度な測定機器を活用し、バイオマス発電所焼却灰等の安全性試験及び植物残渣由来フリーセラミドの分析方法の開発を行いました。

今後も、企業、大学及び県公設研究所等と連携を図り、廃棄物の資源循環利用促進の課題解決に向けた取り組みを進めていきます。

1) （株）ジェヌインR&D：宮鍋征克、開 忍、羅 霄霖、セラミド生成用組成物。特開 2021-103950

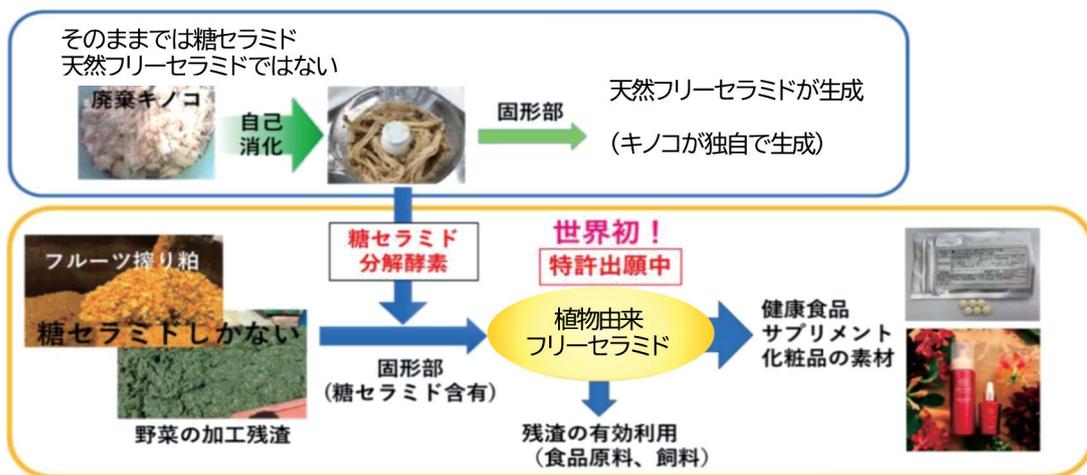


図2 廃棄キノコ抽出物による植物由来フリーセラミドの製造プロジェクトの概要