下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討

風間 しのぶ¹, 真砂 佳史², 沼澤 聡³, 大村 達夫⁴

¹正会員 東北大学未来科学技術共同研究センター (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-04)
kazama@niche.tohoku.ac.jp

²正会員 国際連合大学サステイナビリティ高等研究所 (〒150-8925 東京都渋谷区神宮前 5-53-70)
masago@unu.edu

³メタウォーター株式会社 プロダクトセンター プラント設計部
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-25)
satoshi.numa3104@gmail.com

⁴正会員 東北大学 未来科学技術共同研究センター (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-04)
omura@niche.tohoku.ac.jp

流入下水中の病原微生物の存在は地域における感染性胃腸炎の流行状況の指標として有用である。しかしながら、下水に存在するウイルスの多くがバクテリオファージでヒト病原ウイルスの相対的存在量は極めて少ないことから、下水中の全ウイルスを対象としたメタゲノム解析にてヒト病原ウイルスを検出することは非効率的である。本研究では、多くのヒト消化器系ウイルスが属する 1 本鎖 (+) RNA ウイルスのみを対象としたメタゲノム解析手法を考案し、流入下水試料に適用した。その結果、下水中のウイルスの多くを占めるバクテリオファージの排除と植物ウイルス由来の配列数の減少に成功し、下水中の全ウイルスを対象としたメタゲノム解析より 10 倍の効率でヒトに感染するウイルス (3 科 5 属) を検出することができた。

Key Words: Enteric virus, Metagenomic analysis, Wastewater, Pyrosequencing

1. 序論

地域における感染性胃腸炎の流行状況は下水中に存在する病原微生物の検出により端的に把握可能である。ノロウイルスをはじめ主なヒト消化器ウイルスの存在については、感染性胃腸炎サーベイランスや下水からの検出状況の報告によって明らかになりつつある¹⁻⁴⁾。しかしながら、感染性胃腸炎を引き起こすウイルスの気候変動による生態系の変化やグローバル化等によるわが国への新たな移入によって、今後監視の対象とすべき病原ウイルスが増加することが考えられる。このような状況に対応するには、想定内のウイルスも含め想定外の複数ウイルスを同時に検出可能な手法、つまりヒト病原ウイルスの網羅的な検出手法が求められる。多くのウイルスは培養法が確立されていないため、従来ウイルスの検出や同定には定量 PCR 法やシーケンシング (サンガー法) が用いられてきた⁵⁾。しかし、これらの手法

はウイルスを個別に検出しなければならないため、ウイルスを網羅的に検出する新たな手法が必要となる。

パイロシーケンシング法は一度に膨大な塩基配列を取得可能であるため、多数のウイルスを遺伝子型レベルで同時に検出および同定可能な技術である。近年この手法を用いたヒトや環境中でのウイルスの多様性や進化、そして未知のウイルスの検出等についての研究が行われており⁶⁻⁸⁾、さらに下水中のウイルスのメタゲノム解析への適用例も報告^{9,10)}されている。特に下水のメタゲノム解析では、下水に存在するウイルスのほとんどがバクテリオファージ (82%) で、次に植物ウイルス (17%) であり、ヒト病原ウイルスの相対的な存在量は極めて少ない (1%) ことが明らかになっている⁹⁾。これは全ウイルスを対象としたメタゲノム解析で下水中のヒト病原ウイルスを検出するのは非常に非効率的であることを意味する。

この課題は、ウイルスのメタゲノム解析を行う際、バクテリオファージのゲノムをあらかじめ排除しておくことで解決できると考えられる。本研究では、この課題を解決するために解析対象ウイルスを1本鎖(+) RNA ウイルスとし、その特徴を利用することでヒト消化器系ウイルスゲノムを効率的に検出する手法を開発した。感染性胃腸炎を引き起こす代表的なヒト消化器系ウイルスとして2本鎖DNA ウイルスであるアデノウイルス、2本鎖RNA ウイルスであるロタウイルス、および1本鎖(+) RNA ウイルスであるノロウイルス、サボウイルスおよびエンテロウイルス等があるが、ヒト消化器系ウイルスの多くは1本鎖(+) RNA ウイルスであることから、同ゲノム構造を有するウイルスを対象とすることは現在および今後感染性胃腸炎を引き起こすヒト消化器系ウイルスの多くを検出可能であると期待できる。

この手法の要は、全てのウイルスゲノムの中からいかにファージゲノムを排除してヒト消化器系ウイルスゲノムを回収および増幅するかという点である。これには、ヒトに感染する1本鎖(+) RNA ウイルスゲノムは有するが、ファージゲノムは有さない特徴を利用した。すなわち、ヒト消化器系ウイルスゲノムは真核生物のmRNAと同じ構造を持ち、その3'末端にポリA鎖(50-200程度の連続するアデニン鎖)を有するが、バクテリオファージはポリA鎖を有さないという特徴である¹¹⁾。従って、ポリA鎖を有するRNAゲノムのみを回収することでバクテリオファージゲノムを排除し、効率的にヒト消化器系ウイルスゲノムをパイロシーケンシングに供することが可能になると考えられる。そこで、真核生物のmRNAの増幅に用いられているポリA鎖を起点に逆転写および増幅しゲノムの全長を得るSwitching Mechanism At 5'End of RNA Template (SMART)法を用い、ウイルスゲノムの中からポリA鎖を有するRNAウイルスゲノムのみを逆転写および増幅し、パイロシーケンシングに供することを新たに考案した。ウイルスの検出手法の開発においてはその検出効率を評価することが重要となるため、本研究で用いた膜ろ過によるウイルス回収手法の回収率を評価した。また、SMART法を用いた増幅手法において、cDNAの増幅倍率がウイルスの種類、濃度やゲノム上の領域により異なり、それぞれのウイルスゲノム検出数を過大または過小評価することが懸念される。そこで、複数のウイルスで構成した模擬ウイルスライブラリーを用いて各ウイルスの増幅倍率を比較し、SMART法によるウイルス増幅手法の評価を行った。

2. 実験方法

(1) 下水中ウイルスのメタゲノム解析

a) 下水試料からのウイルス濃縮液の作成

下水試料として2012年12月に国内の下水処理場において流入下水2Lを採水した。同下水処理場は約7,000人の居住者からの都市下水を処理している。下水試料は氷上で保冷して輸送し、直ちに濃縮を行った。

ウイルスの濃縮は2Lの下水試料を一度に処理可能なTamakiらの手法¹⁰⁾を参考に行った。まず、2Lの下水試料を8Lのリン酸緩衝液で希釈したのち、攪拌機(トルネードSMT-101, SHIBATA)を用いて400 rpmで30分攪拌した。希釈した下水試料を孔径1.2 μm のガラス繊維フィルター(GF/C, GE Healthcare)を用いてろ過し、比較的大きな浮遊物質を除去した。次に2段階のタンジェンシャルフローろ過(TFF)にて細菌や有機物等(100 kDa以下)の夾雑物を除去し、試料を濃縮した。まず、孔径0.2 μm のろ過膜(Vivaflow 200, VF20P7, Sartorius)を用いて流速310 mL/min、膜圧1 bar(EYELA ROLLER PUMP RP-1000, 東京理化器械株式会社)でろ過した後、分子量分画100 kDaのろ過膜(Vivaflow 200, VF20P4, Sartorius)を用いて、流速415 mL/min、膜圧1 bar(EYELA ROLLER PUMP RP-1000, 東京理化器械株式会社)で濃縮した(濃縮後液量約43 mL)。この濃縮液をOptima L-100XP(Beckman Coulter)を用いて100,000 $\times$ g、4℃で1時間超遠心し、上清を取り除いた。得たペレットに1.8 mLのリン酸緩衝液を添加し、4℃で1晩静置した後ピペッティングにて再懸濁してウイルス濃縮液とした。

b) ウイルスRNAの抽出とRNase およびDNase 処理

ウイルスRNA抽出の前処理として、ウイルス濃縮液中の遊離RNAをRNase ONE Ribonuclease(Promega)にて分解した。この前処理には623 μL のウイルス濃縮液、7 μL のRNase ONE Ribonucleaseおよび70 μL の10 $\times$ Reaction Bufferからなる反応溶液をThermomixer comfort(Eppendorf)にて300 rpmで攪拌しながら37℃で1時間反応させた。また、反応溶液中に残存するRNaseとその他のタンパク質分解を目的に3.5 μL (最終濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のProteinase K(QIAGEN)を添加し、300 rpmで攪拌しながら37℃で1時間反応させた。前処理をしたウイルス濃縮液(700 μL)をQIAamp Viral RNA Mini QIAcube kit(Qiagen)およびQIAcube(Qiagen)にて抽出し、300 μL の核酸抽出液を得た。続いてRQ1 RNase-Free DNase(Promega)を用いて核酸抽出液に存在する

DNA を分解した。これには 300 μ L の核酸抽出液に 3.5 μ L の RQ1 RNase-Free DNase および 35 μ L の 10 $\times$ RQ1 DNase Reaction Buffer を加え、300 rpm で攪拌しながら 37°C で 1 時間反応させた後、35 μ L の Stop Solution を加え、300 rpm で攪拌させながら 65°C で 30 分反応させることで DNase を分解した。最後に DNase 処理済みの核酸抽出液 (385 μ L) を RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) にて精製および濃縮を行い、34 μ L のウイルス RNA 濃縮液を得た。

c) 逆転写および増幅反応

本研究で対象としているポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウイルスゲノムの逆転写および増幅には、ポリ A 鎖を起点に完全長逆転写反応および cDNA の増幅が可能な SMARTer Pico cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いた。キットのプロトコルを参考に逆転写反応を行い、DNA ポリメラーゼに KOD-Plus Ver. 2 (TOYOBO) を用いて増幅反応を以下の通り行った。まず、ポリ A 鎖に逆転写プライマー (oligo-dT つきプライマー) を付加させた。5 μ L のウイルス RNA 濃縮液、7 μ L の 3' SMART CDS Primer IIA (oligo-dT つきプライマー)、45 μ L の Nuclease-Free 水から成る反応液を 72°C で 3 分保温したのち 42°C に冷却し、ただちに 57 μ L の反応液に 20 μ L の 5 $\times$ First-Strand Buffer、2 μ L の DTT、10 μ L の dNTP Mix、7 μ L の SMARTer IIA Oligonucleotide、5 μ L の RNase Inhibitor および 5 μ L の SMART Scribe Reverse Transcriptase を加えて 42°C で 1 時間の後、70°C で 10 分保持することで逆転写反応を行った。作製した cDNA を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いて精製および濃縮し、80 μ L の cDNA 溶液を得た。得た cDNA 溶液 40 μ L に 1.6 μ L の KOD-Plus⁻、8 μ L の 10 $\times$ Buffer for KOD-Plus Ver. 2、8 μ L の 2 mM dNTPs、4.8 μ L の 25 mM MgSO₄、1.6 μ L の 5' PCR Primer IIA および Nuclease-Free 水を加えて作製した反応液 80 μ L を用いて PCR にてウイルスゲノムの増幅を行った。PCR 条件は 94°C 2 分の後、98°C 10 秒、65°C 30 秒および 68°C 10 分から成るサイクルを 40 回繰り返し、最終伸長として 68°C で 7 分保持した。得た PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いて精製し、150 μ L の精製 PCR 産物を得た。

d) PCR 産物の断片化

PCR 産物をパイロシーケンサーで解析可能な塩基長にするため、超音波破碎機アコースティックソルビライザー S200 (Covaris) にて約 500 bp に断片化した。反応条件は Peak Power: 105.0, Duty Factor: 5.0 および Cycles/Burst: 200 として 80 秒間照射した。断片化した PCR 産物から短断片を除去するために

MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、30 μ L の断片化産物を得た。断片化産物の DNA 濃度および純度をそれぞれ OD260 および OD260/280 を Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) にて測定することで確認した。

e) パイロシーケンシング

得た断片化産物をプロトコルに従い、GS Titanium Rapid Library Preparation kit, GS Junior titanium emPCR kit (Lib-L), GS Junior Titanium sequencing Kit および GS Junior Titanium PicoTiter Plate Kit (全て Roche Applied Science) を用いて前処理をおこない、GS Junior system (Roche Applied Science) を用いたシーケンシングに供した。

f) データ解析

GS Junior system から得た塩基配列から信頼性の低い配列を QIIME ver. 1.8.0 ソフトウェア¹²⁾ の Split_libraries.py プログラムを用いて除去した。除去する配列の条件は、配列の平均 Quality Score が 25 未満、塩基長が 100 bp 未満または 10 bp 以上のホモポリマーを含む配列とした。得た配列に対して BLAST + ver. 2.2.28 ソフトウェア¹³⁾ の BLASTn 検索にて相同性検索 (e-value: e-30 以下) を行い、MEGAN ver. 4.70.4¹⁴⁾ を用いて分類した。また、得たウイルスリード数をもとに選択した一部のウイルスの配列を Bowtie ver. 2.1.0¹⁵⁾ および Tablet ver. 1.13.12.17 ソフトウェア¹⁶⁾ を用いて参照配列に対してマッピングし、得た配列の検出領域を確認した。

(3) ウイルスの培養

ポリオウイルス 1 型 Sabin 株 (PoV, Accession No.: V01150.1) は Sano らの手法¹⁷⁾ に従い培養した。マウスノロウイルス S7-PP3 株 (MNV, Accession No.: AB435515.1) は日本大学遠矢幸伸教授にご提供いただき、北島らの手法¹⁸⁾ に従い培養した。

(4) ウイルス回収手法の評価

ウイルスの検出においてはその回収効率が重要となる。モデルウイルスを添加してその回収率により回収手法を評価することは広く実施されているが、この添加回収評価はメタゲノム解析においては適切でない。その理由は、回収率評価のために比較的高濃度で添加されるモデルウイルスゲノムが試料中のウイルスゲノムの検出を妨げる (シーケンシングで得る配列数の多くがモデルウイルスゲノム由来となる) からである。そこで本研究では、前述の膜ろ過による回収法 (TFF 法) とポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法を用いてそれぞれ回収した下水試料中のウイルスを定量 PCR 法で測定し、得た濃度を比較

表-1 完全長増幅評価に用いたプライマーおよびプローブ

ウイルス	プライマーおよびプローブ	塩基配列 (5'-3')	増幅領域*
PoV	Polio5_F	TTGTGGCTGCTTATGGTGAC	574-649
	5'末端近傍領域	Polio5_R	
		ACTCAATGGAGCGAATCCAG	
	Polio5_IN	FAM-ATTGGCCATCCGGTGAAAGTGAGA-TAMRA	6751-6804
	3'末端近傍領域	Polio3_F	
		AATCGGATTCGGAGACAGAG	
MNV	Polio3_R	TGAGCAACCAGATGGCATAC	596-666
		Polio3_IN	
		FAM-TCGACTACCTAAACCACTCACACCAGGTG-TAMRA	
	5'末端近傍領域	MNV5_F	6680-6787
		MGCTTGTATCCCAACAATC	
		MNV5_IN	
		FAM-ACCGTCAACTGCTACCAGGTCTGTG-TAMRA	
		MNV3_F	
		AATGGCTGGTGCACCTCTTT	
		MNV3_R	
		TGCCTGAAGATTCTGGACTG	
		MNV3_IN	
		FAM-GAGGTGGCCTAATGGGCATAATTG-TAMRA	

*PoV (Accession No.: V01150.1); 7441 nt, MNV (Accession No.: AB435515.1); 7382 nt

することで、回収手法の評価を行った。

下水試料は2013年2月、4月および6月に前述の下水処理場にて採水した。採水した下水試料は前述のTFF法(2Lの流入下水を使用)およびPEG沈殿法にてウイルスを濃縮回収した。PEG沈殿法では、高濃度で培養可能で多くの1本鎖(+)RNAをゲノムに持つヒト消化器系ウイルスと類似した形状¹⁸⁾であるMNVをプロセスコントロールとして下水試料に添加し、回収率を評価した。40mLの下水試料にMNV(約 10^8 copies)を添加した後、ポリエチレングリコール6000(和光純薬)と塩化ナトリウム(関東化学)をそれぞれ8%および2.3%(w/v)となるように添加し、4℃で1晩穏やかに攪拌した。次に、 $9,000 \times g$ で90分遠心(高速大容量冷却遠心機6000, KUBOTA)した後、ペレットを1mLのPBSでピペティングにより再懸濁させ、1分間激しくボルテックスした。最後に、再懸濁液を $9,000 \times g$ で30分遠心し、得た上清をウイルス濃縮液とした。

ウイルス濃縮液よりQIAamp Viral RNA Mini QIAcube kit (Qiagen)およびQIAcube (Qiagen)にてウイルスRNAを抽出し、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad)を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応液(20 μ L)は4 μ Lの5 $\times$ iScript reaction mix, 1 μ LのiScript reverse transcriptaseおよび15 μ LのRNA抽出液とした。得た5 μ Lの逆転写反応液に対して、SsoFast probes Supermix (Bio-Rad)を用いCFX96 (Bio-Rad)にてヒトに感染するRNAウイルスの中では比較的高濃度で検出されるAichivirus (AiV)^{19,20)}、比較的低濃度で検出されるEnterovirus (EV)²⁰⁾、植物ウイルスで下水中に高い濃度で存在するPepper mild mottle virus (PMMoV)^{20,30,31)}およ

び回収率評価のために添加したMNVゲノムを既存の報告^{18,21-23)}に従いリアルタイム定量PCR法にて定量した。

(5) ウイルスゲノムの増幅倍率と完全長増幅の評価

メタゲノム解析においてポリA鎖を有する1本鎖(+)ウイルスゲノムの逆転写および増幅に用いたSMARTer Pico cDNA Synthesis Kitは、本来mRNAのポリA鎖を起点にoligo-dTプライマーを用いてゲノム全長を逆転写および増幅するキットである。一般的にmRNA(～3000 nt程度)は本研究で対象としているポリA鎖を有するウイルスゲノム(5,000–10,000 nt程度)より短い²⁴⁾ため、本キットを用いて下水試料中の異なる濃度のウイルスゲノムが存在量比を保持したまま増幅可能であるか(高濃度のウイルスゲノムと低濃度のウイルスゲノムの増幅倍率が同様であるか)、またウイルスゲノム全長の増幅が可能であるか不明である。これら2点を検証するためにPoVおよびMNVを濃度比100:1で混合した模擬ウイルスライブラリー(PoV: 1×10^5 copies/ μ L, MNV: 1×10^3 copies/ μ L)を作成し、各ウイルスゲノムの増幅倍率と完全長増幅について評価した。模擬ウイルスライブラリーから前述の方法同様に核酸を抽出し、SMARTer Pico cDNA Synthesis Kitを用いた逆転写反応およびゲノム増幅の前後で、リアルタイム定量PCR法でPoVおよびMNVゲノムを定量した。各ウイルスゲノムの増幅倍率およびゲノム全長の増幅の評価にはPoVおよびMNVの5'末端および3'末端近傍領域を定量し、各系における増幅倍率を比較した。各ウイルスゲノムの5'末端近傍領域および3'末端近傍領域の定量に用いたプライマーおよび

図-1 TFF 法および PEG 沈殿法を用いて回収したウイルスの流入下水中濃度

図-2 各系におけるウイルスゲノムの増幅倍率

図-3 メタゲノム解析で得た配列の分類、配列数と配列数の割合

プローブは Primer 3 ソフトウェアを用いて設計した (表-1)。PCR 反応溶液 (20 μ L) は 10 μ L の SsoFast probes Supermix (Bio-Rad), 5 μ L の増幅産物および各プライマーと TaqMan プローブをそれぞれ 300 nM および 200 nM となるように加えた。PCR 条件は 95℃ で 2 分保持した後、95℃ で 30 秒、58℃ で 30 秒 および 72℃ で 20 秒のサイクルを 50 サイクル実施し

た。なお、増幅前の各ウイルスゲノムの定量には前述同様 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行った。なお、本定量系における MNV (および PoV) の定量限界は 10 copies/tube (ウイルスゲノム抽出前の試料中に 2×10^2 copies/ μ L) であり、さらに SMARTer Pico cDNA Synthesis Kit を用いてのゲノム増幅に必要なウイルスゲノム数について検討した結果、同様に 2×10^2 copies/ μ L 以上の MNV (および PoV) ゲノムを要したため (データ未記載)、模擬ウイルスライブラリー中の MNV 濃度は増幅前の MNV ゲノムが確実に定量可能な濃度 (1×10^3 copies/ μ L) に設定した。

3. 結果

(1) ウイルス回収手法の評価

TFF 法および PEG 沈殿法を用いて回収した AiV, EV および PMMoV の流入下水中の濃度を図-1 に示す。6 月の EV を除くすべてのウイルスについて、TFF 法より PEG 沈殿法での検出濃度が高く、回収率が良いことがわかった。なお、PEG 沈殿法で添加した MNV の添加回収率は 2 月、4 月および 6 月でそれぞれ 9.0、5.4 および 12.4% (幾何平均値: 8.4%) であった。PEG 沈殿法によるウイルス濃度と MNV を用いた回収率から実際の下水中ウイルス濃度を換算し、TFF 法による AiV, EV および PMMoV の回収率を算出したところ、それぞれの幾何平均値は 1.0%, 0.2% および 0.008% であった。なお、6 月の TFF 法による EV の回収率については、同月の PEG 沈殿法で得た EV が定量限界以下であり下水中の実際の EV 濃度が換算できなかったため、2 月と 4 月の結果のみを用いた ($n=2$)。TFF 法における供試料液の濃縮倍率は約 10^3 倍 (下水 2 L を 1.8 mL に濃縮) であるのに対して、PEG 沈殿法のそれは 40 倍 (下水 40 mL を 1 mL に濃縮) であった。したがって、この供試料量の違いが影響し、6 月の PEG 沈殿法による EV が定量限界以下になったと考えられた。

図-1 で示したように、手法の違いによる検出濃度の差はウイルスによって異なっており、ヒト消化器系ウイルスである AiV (幾何平均値: 0.92 log₁₀) および EV (同: 1.6 log₁₀) と比べ、植物ウイルスである PMMoV (同: 3.0 log₁₀) の差が大きかった。この手法による検出濃度の差について Stat Plus: mac 2009 を用いて実施した Scheffé テストでは AiV と PMMoV にのみ有意な差 ($p=0.021$) があった。

表-2 検出されたウイルスの分類

Genome	Host	Family	Genus	Species	No. of Reads
(+)ssRNA*	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Pepper mild mottle virus	524
(+)ssRNA	Human	Picornaviridae	Kobuvirus	Aichivirus A	122
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Norovirus	Norwalk virus	91
dsRNA	Plant	Partitiviridae	Unclassified Partitiviridae	Carrot cryptic virus	85
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Marine RNA virus SF-1	79
(+)ssRNA	Plant	Potyviridae	Potyvirus	Turnip mosaic virus	46
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Youcai mosaic virus	43
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 1	41
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Niflavivirus	27
(+)ssRNA	Plant	Tombusviridae	Carmivirus	Carnation mottle virus	21
dsRNA	Plant	Partitiviridae	Betacryptovirus	Dill cryptic virus 2	15
dsRNA	Plant	Partitiviridae	Betacryptovirus	Crimson clover cryptic virus 2	12
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 6	10
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Wasabi mottle virus	8
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Tobacco mosaic virus	5
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Tobacco mild green mosaic virus	4
(+)ssRNA	Human	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 8	2
dsRNA	Plant	Partitiviridae	Unclassified Partitiviridae	Primula malacoides virus	2
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Bell pepper mottle virus	2
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Hibiscus latent Singapore virus	2
(+)ssRNA	Dog	Astroviridae	Mamastrovirus	Mamastrovirus 5	1
(+)ssRNA	Human	Picornaviridae	Cosavirus	Cosavirus A	1
(+)ssRNA	Human	Caliciviridae	Sapovirus	Sapporo virus	1
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Rehmannia mosaic virus	1
(+)ssRNA	Plant	Virgaviridae	Tobamovirus	Cucumber green mottle mosaic virus	1
(+)ssRNA	Plant	Betaflexiviridae	Carlavirus	Shallot latent virus	1
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexiviridae	Potexvirus	Cymbidium mosaic virus	1
(+)ssRNA	Plant	Alphaflexiviridae	Potexvirus	White clover mosaic virus	1
(+)ssRNA	Bacteria	Leviviridae	Levivirus	Enterobacteria phage BZ13	1
(+)ssRNA		unclassified (+)ssRNA viruses		Picalivirus C	1

*1本鎖(+)RNA

(2) ウイルスゲノムの完全長増幅における増幅倍率の評価

模擬ウイルスライブラリーを用いて評価した、SMARTer Pico cDNA Synthesis Kit によるウイルスゲノムの増幅倍率を図-2 に示す。PoV および MNV の 5'末端近傍領域での増幅倍率がそれぞれ $10^{2.9}$ 倍と $10^{2.8}$ 倍、3'末端近傍領域では $10^{4.7}$ 倍と $10^{4.9}$ 倍であり、各系とも増幅倍率が同様であったことから、このキットは試料中のウイルスゲノムの相対濃度を保ったまま増幅することが可能であると考えられた。しかし、いずれのウイルスも 3'末端近傍領域より 5'末端近傍領域における増幅倍率が 100 倍程度低かったことから、3'末端からの逆転写反応において多くのゲノムが 5'末端まで伸長されず、その後の PCR でウイルスゲノム全長が増幅されていないことが示唆された。

(3) 下水中ウイルスのメタゲノム解析

GS junior システムによるパイロシーケンシングにより得た配列 (55,331 配列) に対してクオリティフィルタリングを実施した結果、31,753 配列を得た。得

た配列を BLASTn 検索にて同定し分類した結果を図-3 に示す。検索に供した配列の 96% がデータベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上のいずれの配列にも近縁でない配列 (No hit) であった。同定された配列 (4%) については、真核生物 (85 配列) や細菌 (67 配列) に近縁な配列はわずかで、ウイルス (1,155 配列) が最も多く、同定された配列の 88% を占めていた。さらに、同定されたウイルスは全て RNA ウィルスであった (表-2)。

ウイルスとして同定された配列は 10 属 30 種に分類された。このうち植物ウイルスの配列数 (774 配列, 67%) が最も多く検出され、分類された種についても 6 属 18 種で最多であった。植物ウイルスの中では PMMoV の配列が 524 配列と最も多く検出された。

ヒトに感染するウイルスは 268 配列 (ウイルス由来の配列中 23%) が検出され、3 科 (Picornaviridae, Caliciviridae および Astroviridae) および 5 属 (Kobuvirus, Norovirus, Mamastrovirus, Cosavirus および Sapovirus) に分類された。その中で最も多く検出されたウイルスは Kobuvirus (122 配列) で、続いて

図-4 *Norovirus* および *Mamastrovirus* の遺伝子型および亜型と配列数。A; *Norovirus*, B; *Mamastrovirus*

寒冷期に下水から頻繁に検出され主な感染性胃腸炎の原因である *Norovirus* (91 配列), および *Mamastrovirus* (56 配列) であった。 *Kobuvirus* として

同定された配列は全てヒトに感染する *Aichivirus A* の *Aichivirus 1* であったのに対して, *Norovirus* と *Mamastrovirus* は複数の遺伝子型や亜型が検出された (図-4)。 *Norovirus* の中で最も多く検出された遺伝子型は GII. 4 (62 配列, 68%) で, 続いて GI. 6 (22 配列, 24%) であった。 GII. 4 の亜型については, New Orleans 2009 および Den Haag 2006b も検出されたが, 2012-2013 年シーズンに流行拡大した Sydney 2012 (54 配列, 59%) が最も多く検出され, 同シーズンにおける流行状況の特徴を示すことができた。 *Mamastrovirus* については, 4 種 (*Mamastrovirus 1*, 5, 6 および 8) が検出された。 *Mamastrovirus 1* では Human astrovirus 1 (1 配列) および Human astrovirus 8 (40 配列), *Mamastrovirus 5* は Canine astrovirus (1 配列), *Mamastrovirus 6* は Human astrovirus MLB1 (10 配列), および *Mamastrovirus 8* は Human astrovirus MLB2 (2 配列) に分類された。

未分類のウイルスとして Marine RNA virus SF-1 (79 配列), Niflavivirus (27 配列), および Picalivirus (1 配列) が検出された。 これら 3 種はいずれも下水試料から初めて検出されたウイルスである (Marine RNA virus SF-1 および Picalivirus はサンフランシスコ (アメリカ), および Niflavivirus はカトマンズ (ネパール) でそれぞれ採取された下水) ²⁹⁾。 これまで他の地域においてこれらウイルスの検出報告はな

図-5 参照配列に対する配列マッピング。 A); PMMoV, B); *Norovirus* GII. 4 Sydney 2012, C); Marine RNA virus SF-1

かったが、本研究では比較的多くの配列が検出された。

(4) 参照配列へのマッピング

検出された配列数の最も多かった PMMoV、感染性胃腸炎の主な原因である *Norovirus* GII.4 2012 Sydney 亜型、およびこれまで検出報告数の少ない Marine RNA virus SF-1 について、参照配列（各 AB550911, KC631827 および JN661160）に対して配列のマッピングを行った。本研究では完全長を増幅可能な手法を用いたことから、得た配列がゲノム全長に対して均等にマッピングされることが期待されたが、結果としては一部の領域に集中してマッピングされた。PMMoV については 2300–3800 nt の領域、*Norovirus* と Marine RNA virus SF-1 についてはポリ A 鎖に隣接の 3'末端近傍が増幅されていた（図-5）。植物ウイルスである PMMoV は 3'末端にポリ A 鎖を有さないが、PMMoV ゲノムの 3,829 nt からアデニンが連続する領域（AAA GAA AAG AAA AAA CCC AAA AA）を有することから、この領域に逆転写プライマー（oligo-dT プライマー）が結合し、増幅したと考えられた。いずれのウイルスゲノムについても、前述の完全長増幅評価で示された結果と同様、5'末端まで伸長していないことが示された。

4. 考察

本研究で同定されたウイルス配列（1,155 配列）のうちヒトに感染するウイルスは 23%（268 配列）を占めた。これは、試料や実験条件の違いから単純比較することはできないが、全ウイルスを検出対象としたメタゲノム解析⁹⁾より 10 倍以上の割合であった。その結果、多数のウイルスを種や遺伝子型・亜型レベルで同定し、さらに、これまで報告の少ないウイルスを検出することができた。*Mamastrovirus* については 4 種が検出されたが、*Mamastrovirus* 6 に属する Human astrovirus MLB1 および *Mamastrovirus* 8 に属する Human astrovirus MLB2 は近年新たな系統として報告されており、日本においても患者数の増加と環境水中からの検出が報告されている^{25–28)}。また、これまで日本では検出報告のない Marine RNA virus SF-1, Picalivirus および Niflavivirus が検出された。本研究で検出されたウイルスは配列数が多い順に PMMoV, AiV および NoV であり、1 年を通して高濃度で検出される PMMoV^{21,30,31)} および AiV^{19,20)}、続いて寒冷期に高濃度で検出される NoV⁴⁾であったことから、既報と合致する結果となった。これらの

結果は、1 本鎖（+）RNA ウイルスゲノムを選択的にパイロシーケンシングに供したことで下水中で相対的な存在濃度が低いウイルスゲノムの検出を可能とし、これまで報告数が少ないヒト消化器系ウイルスや未分類ウイルスを含め人間社会に存在するウイルスの検出を可能としたことを端的に示していると考えられる。

また、本研究でウイルス回収に用いた TFF 法が、ヒトに感染するウイルスの配列数を増加させることに成功した要因の 1 つである可能性が考えられた。既存の報告（ろ過は行わず凝集沈殿にてウイルスを濃縮）⁹⁾ではバクテリオファージを除き、ウイルスとして同定された配列の 90% 以上が植物ウイルスであったのに対し、本研究では 67%と既存の報告より低かった。下水中に高濃度で存在しており^{21,30,31)}、本研究でも最も多くの配列が検出された *Tobamovirus* に属する PMMoV は長さ約 300 nm、直径約 18 nm の棒状の植物ウイルス³²⁾である。したがって、TFF 法で使用した孔径 0.2 μm の膜によるろ過によって PMMoV が除去され、その検出数が減少した可能性が考えられる。これは PEG 沈殿法と TFF 法による下水中 PMMoV 濃度の差が他のウイルスに比べて顕著に大きかった（図-1）ことから示唆された。また、本研究で検出されたその他の *Tobamovirus* も同様の形状であることから、PMMoV 同様ろ過によって除去されたことが考えられた。さらに、*Tobamovirus* はゲノムの 3'末端にポリ A 鎖を有さないため、配列に存在するアデニンリッチな領域を起点として逆転写反応が始まったと考えられたが、ゲノム 3'末端のポリ A 鎖に比べその領域が短いため oligo-dT プライマーが結合しにくく、逆転写効率が低かったと考えられた。すなわち、ろ過と選択的なウイルスゲノムの増幅により植物ウイルスの検出を減少させ、ヒトに感染するウイルスの配列数を増加させることができたと考えられた。

本手法は既知のウイルスを網羅的に検出するだけでなく、未知ウイルスの検出にとっても有用な手法と考えられる。本研究で得た配列の 96%がデータベース上のいずれの配列にもヒットしない配列（No hit 配列）であった。現在、国際ウイルス分類委員会（International Committee on Taxonomy of Viruses）には 3,186 種のウイルスが登録されているが、地球上に存在するウイルスのほとんどはまだ発見されておらず、哺乳類に感染するウイルスだけでも 32 万種存在すると推定されている³³⁾。No hit 配列は未発見ウイルスゲノム情報が膨大に含まれているデータベースと考えられ、新たなウイルスの発見につながる有用な情報源と考えられる。De novo（参照配列の無い生

物種のゲノム配列からその全ゲノムマップを組み立てる) 解析等により新たな 1 本鎖 RNA ウイルスの発見を試みる場合、あらゆるゲノムが混在するデータベースよりも含まれる配列の多くが 1 本鎖の RNA ウイルス由来であると考えられるデータベースを用いる方が効率的である。

No hit 配列から新規ウイルスの検出やゲノム全長の配列決定を行うには、そのウイルスの可能な限り広範囲のゲノム配列を得ることが重要となる。本手法はウイルスを同定するための手法としては十分な情報を得ることができたが、完全長増幅の評価および参照配列へのマッピング結果で示したように、ウイルスゲノムの一部の領域のみが増幅され、シーケンシングされたことがわかった。これはウイルスゲノムの損傷やゲノムの高次構造箇所が逆転写反応あるいは伸長が停止した可能性が考えられた。従って、ポリ A 鎖を有する RNA ウイルスゲノムを回収した後の増幅手法を改善することが必要と考えられる。また、2. 実験方法 (5) で述べたように、本手法で用いた SMARTer Pico cDNA Synthesis Kit は低濃度で存在するウイルスを検出することができない (2×10^2 copies/ μ L 以上必要)。しかしながら、低濃度で下水中に存在するウイルスは今後流行する可能性が考えられる監視対象とすべきウイルスである。これらウイルスを検出するには、まず、ウイルス回収手法を改善する必要があると考えられる。TFF 法は 1 度に大容量を処理できるが回収率が低いことから、より効率的な手法を検討すべきである。次に、ウイルス RNA の抽出に用いた QIAamp Viral RNA Mini QIAcube kit では carrier RNA として約 100 – 10,000 nt (約 1,500 nt が最も多く含まれる) のポリ A 鎖を用いている。本研究で RNA の精製を目的に用いた RNeasy MinElute Cleanup Kit では 200 nt 以上のポリ A 鎖はサンプル中に残存してしまうことから、oligo-dT を用いた逆転写時に carrier RNA 由来のポリ A 鎖が本研究のターゲットであるポリ A 鎖を有する 1 本鎖 RNA ウイルスゲノムの逆転写を阻害した可能性が考えられる。従って、carrier RNA を代替 (例えば yeast tRNA) する、あるいは磁気シリカ粒子を用いた抽出法に変更することでターゲットとするウイルスの回収・増幅効率の向上が見込まれる。

また、本研究では MNV の添加回収率から TFF 法の回収率評価を行ったが、MNV はあくまでもモデルウイルスであり、実際下水中に存在するウイルスが同様の回収率効果であることには疑問が残る。今回評価に用いた PMMoV および AiV は濃縮を行わなくても検出可能な濃度であったことから、これらのように下水に高濃度で存在するウイルスの濃縮前後の

濃度を用いて回収率評価をおこなう等、回収率評価手法も課題の一つと考えられる。以上の懸念点を改善することで、本手法はより有益な手法になると考えられる。また、低濃度サンプルからのシーケンシングや得られるリード数の増加により検出感度の向上が見込まれることから、さらなるシーケンシング技術の発展に期待する。

5. 結論

本研究では、ポリ A 鎖を有する RNA ウイルスゲノムを選択的に増幅することで下水中のヒト消化器系ウイルスを高効率で検出する手法の検討を行った。本手法によって、下水中のウイルスの多くを占めるバクテリオファージを排除することに成功し、さらに下水中に多く存在する植物ウイルスの検出を減少させたことで、実験条件の違いはあるが下水中の全てのウイルスを対象とした既存のメタゲノム解析よりヒトに感染するウイルスを 10 倍の効率で検出することができた。今後、ウイルスゲノムの回収と増幅手法を改善することでより有用な手法となると考えられた。

下水をはじめ、糞便汚染された環境中におけるウイルスのメタゲノム解析についての報告は少ない。特にヒト消化器系ウイルスなど一部のウイルスゲノムのみを対象としたメタゲノム解析手法は存在しない。本研究で開発した手法を基に人間社会におけるヒト消化器系ウイルスによる感染症の流行状況を解析する事により、ウイルス性感染症のリスク低減に向けた施策作りに貢献する事が期待される。

謝辞

本研究は CREST「迅速・高精度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発 (JST, 研究代表者: 大村達夫)」および JSPS 科研費 15K18141 の一環として実施された。

参考文献

- 1) Aw T G., Gin K. YH., Ean Oon L. L., Chen E. X., Woo C. H. : Prevalence and genotypes of human noroviruses in tropical urban surface waters and clinical samples in Singapore, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 75, No. 15, 2009.
- 2) Saito M., Goel-Apaza S., Espetia S., Velasquez D., Cabrera L., Loli S., Crabtree J. E., Black R E., Kosek M., Checkley W., Zimic M., Bern C., Cama V., Gilman R. H., for the Norovirus Working Group in Peru: Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian periurban community, *Clin. Infect.*

- Dis., Vol. 58, No. 4, 2014.
- 3) Vega E., Barclay L., Gregoricus N., Shirley S. H., Lee D., Vinjé J. : Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 52, No. 1, 2014.
 - 4) Kitajima M., Haramoto E., Phanuwat C., Katayama H., Furumai H. : Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan, *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 112, No. 3, 2012.
 - 5) Aw T. G. and Rose J. B. : Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing., *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 23, No. 3, 2012.
 - 6) Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palù G. : Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology, *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 12, No. 11, 2011
 - 7) Alhamlan F. S., Ederer M. M., Brown C. J., Coats E. R., Crawford R. L. : Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater, *J. Microbiol. Meth.*, Vol. 92, No. 2, 2013.
 - 8) Rosario K., Nilsson C., Lim Y. W., Ruan Y., Breitbart M. : Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water, *Environ. Microbiol.*, Vol. 11, No. 11, 2009.
 - 9) Cantalupo P. G., Calgua B., Zhao G., Hundesa A., Wier A. D., Katz J. P., Grabe M., Hendrix R. W., Girones R., Wang D., Pipas J. M. : Raw sewage harbors diverse viral populations, *MBio*, Vol. 2, No. 5, 2011.
 - 10) Tamaki H., Zhang R., Angly F. E., Nakamura S., Hong P. Y., Yasunaga T., Kamagata Y., Liu W. T. : Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate, *Environ. Microbiol.*, Vol. 14, No. 2, 2012.
 - 11) R. A. Harvey and D. R. Ferrier (石崎泰樹, 丸山敬監訳) : イラストレイテッド生化学 原書 5 版, p. 515, 丸善出版, 2011
 - 12) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. : QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Meth.*, Vol. 7, No. 5, 2010.
 - 13) Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T. L. : BLAST+: architecture and applications, *BMC Bioinformatics*, Vol. 10, No. 1, 2009.
 - 14) Huson D. H., Mitra S., Ruscheweyh H. J., Weber N., Schuster S. C. : Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4, *Genome Res.*, Vol. 21, No. 9, 2011.
 - 15) Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S. L. : Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biol.*, Vol. 10, No. 3, 2009.
 - 16) Milne I., Bayer M., Cardle L., Shaw P., Stephen G., Wright F., Marshall D. : Tablet—next generation sequence assembly visualization, *Bioinformatics*, Vol. 26, No. 3, 2010.
 - 17) Sano D., Fukushi K., Yoshida Y., Omura T. : Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR, *Water Res.*, Vol. 37, No. 14, 2003.
 - 18) 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇多川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた 水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明, *環境工学研究論文集*, Vol. 45, 2008.
 - 19) Kitajima M., Haramoto E., Phanuwat C. and Katayama H. : Prevalence and genetic diversity of aichi viruses in wastewater and river water in Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 77, No. 6, 2011.
 - 20) Kitajima M., Iker B. C., Pepper I. L. and Gerba C. P. : Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes – identification of potential viral indicators, *Sci. Total Environ.*, Vol. 488–489, 2014.
 - 21) Rosario K., Symonds E. M., Sinigalliano C., Stewart J., Breitbart M. : Pepper mild mottle virus as an Indicator of Fecal Pollution, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 75, No. 22, 2009.
 - 22) Kitajima M., Hata A., Yamashita T., Haramoto E., Minagawa H., Katayama H. : Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of aichi viruses in clinical and environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, No. 13, 2013.
 - 23) Monpocho S., Dehee A., Mignotte B., Schwartzbrod L., Marechal V., Nicolas J. C., Billaudel S., Ferre V. : Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR, *BioTechniques*, Vol. 29, No. 1, 2000.
 - 24) Lipman D. J., Souvorov A., Koonin E. V., Panchenko A. R., Tatusova T. A. : The relationship of protein conservation and sequence length, *BMC Evolutionary Biology*, Vol. 2, No. 20, 2002.
 - 25) Finkbeiner S. R., Holtz L. R., Jiang Y., Rajendran P., Franz C. J., Zhao G., Kang G. and Wang D. : Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses, *Virology*, Vol. 6, 2009
 - 26) Jiang H., Holtz L. R., Bauer I., Franz C. J., Zhao G.,

- Bodhidatta L., Shrestha S. K., Kang G. and Wang D. : Comparison of novel constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes, *Virology*, Vol. 436, 2013.
- 27) Khamrin P., Thongprachum A., Okitsu S, Hayakawa S., Maneekarn N. and Ushijima H. : Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan, *J. Med. Virol.*, DOI: 10. 1002/ jmv, 2015.
- 28) Hata A., Katayama H., Kitajima M. and Furumai H. : Wastewater analysis indicates that genetically diverse astroviruses, including strains belonging to novel clades MLB and VA, are circulating within Japanese populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 81, No. 15, 2015.
- 29) Ng T. F. F., Marine R., Wang C., Simmonds P., Kapusinszky B., Bodhidatta L., Oderinde B. S., Wommack K. E., Delwart E. : High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage, *J. Virol.*, Vol. 86, No. 22, 2012.
- 30) Haramoto E., Kitajima M., Kishida N., Konno Y., Katayama H., Asami M., Akiba M. : Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, No. 23, 2013.
- 31) Hamza I. A., Jurzik L., Überla K., Wilhelm M. : Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water, *Water Res.*, Vol. 45, No. 3, 2011.
- 32) Wetter C. : Serological identification of four tobamovirus infecting pepper, *Plant Disease*, Vol. 68, 1984.
- 33) Anthony S. J., Epstein J. H., Murray K. A., Navarrete-Macias I., Zambrana-Torrel C. M., Solovyov A., Ojeda-Flores R., Arrigo N. C., Islam A., Ali Khan S., Hosseini P., Bogich T. L., Olival K. J., Sanchez-Leon M. D., Karesh W. B., Goldstein T., Luby S. P., Morse S. S., Mazet J. A. K., Daszak P., Lipkin W. I. : A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals, *MBio*, Vol. 4, No. 5, 2013.

(2015. 5. 22 受付)

SELECTIVE METAGENOMIC ANALYSIS OF POSITIVE-STRAND RNA VIRUSES IN WASTEWATER

Shinobu KAZAMA, Yoshifumi MASAGO, Satoshi NUMAZAWA and Tatsuo OMURA

The presence of enteric viruses in wastewater reflects the occurrence of infectious gastroenteritis in human society. However, because the relative abundance of human viruses to whole viruses in wastewater is extremely small, it is inefficient to detect human virus with metagenomic analysis targeting whole viruses. Then, by using pyrosequencing, we developed a selective metagenomic approach targeting positive-strand RNA viruses to which many human enteric viruses belong. As a result, we detected RNA viruses consisting of 10 genera and 30 species. Among them, human viruses were classified to 3 families (*Picornaviridae*, *Caliciviridae* and *Astroviridae*) and 5 genera (*Kobuvirus*, *Norovirus*, *Mamastrovirus*, *Cosavirus* and *Sapovirus*). The ratio of sequence reads of human viruses to identified sequence reads was 23%, which was 10 times higher than other studies with metagenomic analysis targeting whole viruses. In addition, sequence reads of bacteriophages were successfully eliminated, and those of plant viruses that are abundant in municipal wastewater were significantly reduced.