



2017年3月22日放送

## 「次世代シーケンサー技術を用いた感染症診断」

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センターセンター長  
黒田 誠

本放送では次世代シーケンサーがもたらす恩恵について、技術革新と検査診断法の高度化とその応用例を交えて概説したいと存じます。

### 病原体検査法の現状と問題点

一般的な病原体検査法として活用されているものに、

- ・ 診療中に簡易・迅速に検査できる抗原・抗体検査キットや、
- ・ 臨床検体から特異的な遺伝子配列を特定する PCR もしくは LAMP 法による検査法が汎用され、それぞれの検査法に特徴的な感度・特異度に合わせて感染症診断に活用されています。

さらに、検体から病原体を分離して同定することは重要であり、選択培地等を用いた病原体の培養検査は可能な限り執り行っていたきたい検査手順であります。適正な治療薬の選択や、公衆・院内の感染伝播を制御する上でも、患者個々の起病病原体の特定は適正な診療処置を行うにあたり非常に重要であります。

一般的に、適正な感染症診断のためには、医師が臨床所見から妥当と判断された“感度、特異度”を有する診断検査キットが第一選択となります。しかしながら、既存検査法は100%の的中率で全ての起病病原体を“網羅”して検出できるわけではありません。検査キットの添付文書には例を挙げると感度 96%、特異度 99% といった指標が必ず記載されており、裏を返せば陰性と判定されてしまう症例は少なからず存在し、十分な感度と特異度を包括的にカバーする検査キットが望ましいことは言うまでもありません。実際、病原体は感染を繰り返すことで塩基変異や相同組換えを伴うことで抗原性を変化させ、免疫を回避しながらある一定のポピュレーションを維持し生存しようと企んでいます。これらしたたかな病原体、特に病原性ウイルスに至っては、数年おきに異なる型

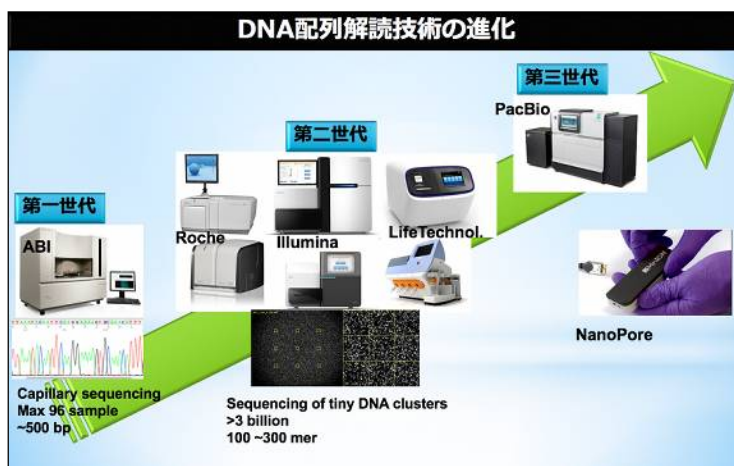
の流行が常態化しており、既存検査法の感度と特異度をカバーできない恐れもあります。“感度・特異度”に加え、“網羅性”を兼ね備えた検査法が好ましく、守備範囲の広い検査法により検査漏れを防ぐことができるでしょう。網羅性も兼ね備えた検査キットの多くは マルチプレックス法やパネル法による同時検出が可能となっています。単一ターゲットの検査キットよりも網羅性が増して臨床診断に有効な結果を提供しています。しかしながら、掲載されている対象は頻出する病原体にのみ絞られており、必ずしも100% カバーする網羅性を謳っているわけではありません。そこで本放送のテーマである、次世代シーケンサー技術を用いた網羅的な感染症診断が期待されています。

### DNA 配列解読技術の進化

全般的に、DNA シーケンサーは、対象サンプルの DNA 塩基配列(アデニン、チミン、グアニン、シトシン)を解読し、サンプル固有の塩基配列を排出します。従来の DNA シーケンサーは、Dye Terminator 法で調整した蛍光ラベル DNA 断片をキャピラリー法による電気泳動にて1塩基毎の塩基長の違いを判別し配列解読する第一世代シーケンサーです。最大96本キャピラリーが搭載され、数時間の解読作業で96検体のスループットが限界数になります。

一方、次世代シーケンサー、もしくは Next-Generation Sequencing と称し、以後、NGS と呼ぶことにしますが、NGS による技術革新は目覚ましく、全ゲノム情報を俯瞰的に把握して全体像を理解する時代へ推進してくれた解析機器です。

NGS はビーズエマルジョン法やガラス基板上のクラスター形成法を採用することにより、数千万個から数十億個の DNA 断片をハイ・スループットで解読することを可能にしました。一度に安価に大量の配列取得が可能となり、一人分のヒトゲノム配列を数日がかつ \$10,000 程度のコストで全ゲノム情報の取得が可能になりました。

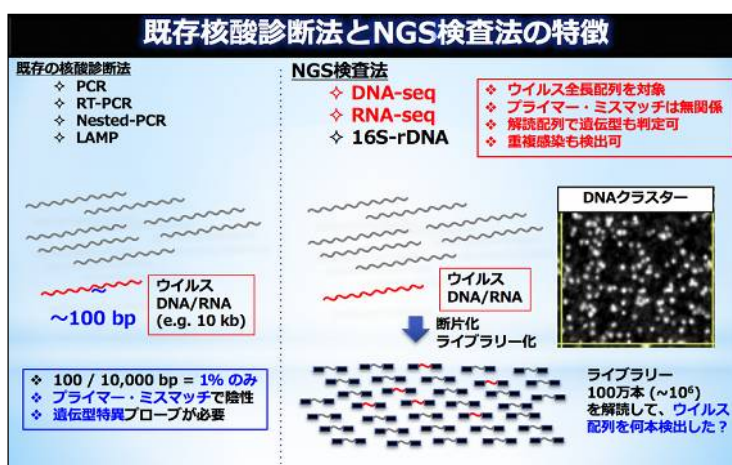


### 核酸診断法と NGS 検査法の比較

参考に、一般的な核酸検査診断法の手順と比較してみましょう。多くの核酸診断法は特異的ターゲットの増幅・検出がメインであり、特異度は高いのですが、網羅性は低い鑑別診断法になります。まれに検出プライマーにミスマッチが存在し、十分な検出感度・特異度が得られず、検査陰性と判定される事例が生じます。

一方、NGS 検査法は所謂メタゲノム解析法と同様の手法を採用しており、サンプルから精製された DNA/RNA 分子の全容を解読対象とします。検出プライマーの配列特性など、全く気にする必要がない解読手法です。臨床検体に内在する DNA もしくは RNA をライブラリー化し、調整したライブラリーを網羅的に解読するため“網羅性”が期待できます。ライブラリー 1 本 1 本個別に配列解読するため、検出された病原体の塩基配列を特定することができ、病原体の種類のみならず、その配列特性から遺伝型の推定も可能になります。

ライブラリーの解読本数によって感度が決定されます。コストはかさみますが、解読量を増やせば増やすほど、感度を向上させることができる仕組みです。検体あたり 100 万本の解読リード数が得られれば、一般的な PCR 検査とほぼ同等の感度が得られていることが我々の経験から分かってきました。

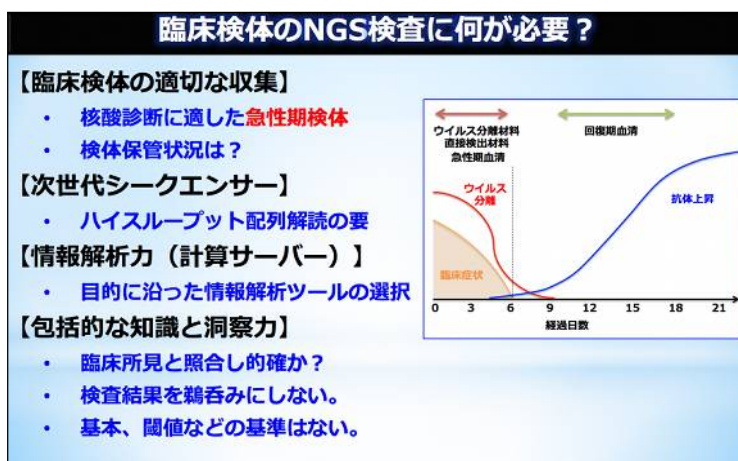


## NGS 検査の留意点

では、NGS 検査を実施するに辺り、ご留意頂きたい点を述べたいと存じます。

核酸検査診断であるため、病原体が有意に検出される急性期検体であることが重要です。発症から 2 週間以上経過した検体を用いる場合には、NGS 検査よりもむしろ、抗体価検査のほうがより適しているケースもあるでしょう。

そして冷凍等の適正な保管管理が重要で、かつ、検体保存液に含まれるウシ血清は網羅配列解読の邪魔になるため使用を避けていただきたいところです。



そして次世代シーケンサーの整備はもちろん、得られる大量の配列データの情報処理ツールの選択も重要です。感染研ゲノムセンターではツール開発を数年前から開始し、一般にも web 公開しております。臨床検体の DNA/RNA をまるごと配列解読しますので、

患者固有のゲノム配列を解読することにもなり、個人情報保護の観点から、ヒトゲノム配列を削除し、残る解読リードから病原体候補の推定を円滑にすすめるためのツールです。皆様にもどうぞご活用頂ければ幸いです。

次に、臨床所見に最も該当する病原体の照合が必要で、ウイルスもしくは細菌感染症のどちらが妥当なのか、バイオマーカー等から有意に示唆される候補を見極めていただきたいところです。



### 検査事例

論より証拠として、まずは検査事例を概説いたします。原因不明脳炎症例からヒトアストロウイルスを検出した事例です。アストロウイルスは腸管症状の約 7% 程度から分離検出されるウイルスです。

患者は4歳。骨髄移植後、数日で下痢・嘔吐を訴え、発熱、意識障害と痙攣、MRI 高信号にて脳症と診断されました。病原体検査ではロタウイルス、アデノウイルス迅速検査キット陰性、ヘルペスウイルス関連の遺伝子検査も陰性。細菌感染症も培養検査にて陰性との結果になりました。

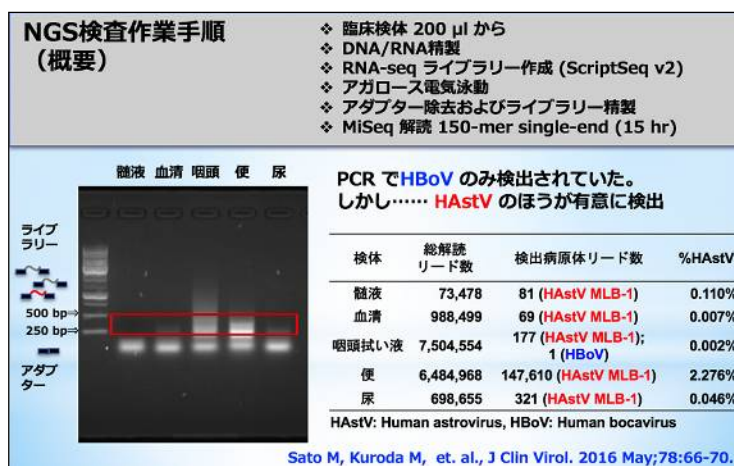
始発の検査材料はごくごく少量からでも NGS 検査を実施可能です。臨床検体 200 μl から DNA/RNA を精製、RNA 解読用のライブラリーを作成し、NGS にて配列解読します。多様な RNA ウイルスによる原因不明症例が想定されるため、RNA 分子の配列解読を最優先とします。

**原因不明の脳炎症例から  
ヒトアストロウイルス  
Human Astrovirus の検出**

**新規遺伝型ゆえに  
検査プライマーが無かった例**

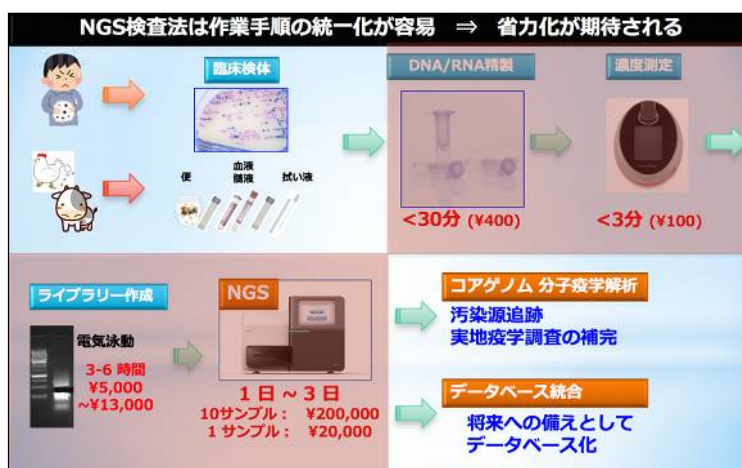
- 患者： 4歳
- 臨床経過
  - 骨髄移植後、3日間下痢症状、2日間嘔吐
  - 下痢症状から2日目に38℃以上の発熱、意識障害、けいれん
  - 頭部MRIで右前頭葉白質にDWI高信号域+
- 病原体検査
  - ロタウイルス、アデノウイルスの迅速診断キット陰性
  - HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, VZV DNAはいずれも陰性
  - 発熱時の血液・髄液・喀痰の細菌培養はいずれも陰性
  - 髄液細胞数増多なし

事前に PCR 検査にて咽頭拭い液からヒトボカウイルスが検出され、唯一の候補でありましたが、NGS 検査により、髄液から便・尿にいたるまで全ての採取検体から有意にヒトアストロウイルス MLB-1 型を検出しました。MLB-1 型の全ゲノム配列は 2012 年に中国から報告があり、新規性の高いウイルス型であったことから従前の PCR 検査で見過ごしていたものと判断し、本症例はヒトアストロウイルスによる脳症であると結論いたしました。



### NGS 検査法の最大の利点

NGS 検査法は感度・特異度に網羅性を加味するのみならず、最大の利点は検査法を統一化できる点にあります。様々な検体から同一作業手順にて解読ライブラリーを作成できます。つまり、対象の病原体に特化したプライマー設計や PCR 反応プログラムの適正化などの諸条件の最適化が全く不要で



あり、NGS 検査法の“まるごと解読”の利点がここに集約されていると考えます。

また、検体に含まれる核酸分子を丸ごと配列解読するため、起因病原体とは全く関連性の無い常在細菌のバックグラウンドを常に検出します。鑑別診断法として格上げされるためには、様々な条件検討と検査基準を整備する必要がありますでしょう。NGS 検査法が排出する情報量が多いため、迅速検査としては未だ改善の余地があり、“情報解析ツール、判断基準、経費”等に課題が山積みです。

それら一つ一つ解決すべく、我々は NGS 検査用の web 情報解析ツール を公開しています。NGS 検査法の標準作業手順書の整備含め、全ての条件が整えば、“効率化・省力化・可用性の高い”病原体検査法として NGS 検査法が機能する日はそう遠くないと想定されます。現状、費用対効果で壁は高いものの、医師が網羅検査データから患者の実像を理解し最適な治療を施せる未来がそう遠くないと期待しております。

## 複雑な解析をクリックだけで可能に！

<b>不明症例</b>	メタゲノム 病原体検索ツール		公開・運用中 2013.9~ (JJID Vol. 67 (2014))
<b>ウイルス ゲノム解析</b>	ウイルスゲノム アセンブルツール		公開・運用中 2016.1~ (Frontiers in Microbiol., 2016)
<b>デング ウイルス</b>	デングウイルス 遺伝型マップ		公開・運用中 2016.6~ (Frontiers in Microbiol., 2016)
<b>結核 炭疽菌</b>	ゲノム分子 系統解析		公開・運用中 2015.11~ (PLoS One. 2015 Nov 13;10(11)) 公開・運用中 2015.1~ (Health Secur. 2015 Jan-Feb;13(1))
<b>カルバペネム 耐性 腸内細菌科細菌 (CRE)</b>	薬剤耐性 プラスミド解析 ネットワーク解析		感染研・細菌第二部 地研と共同運用
<b>細菌ゲノム</b>	自動細菌ゲノム アノテーション ツール		未公開・論文作成中