



医学検査のあゆみ—26

公衆衛生および感染症診断に貢献する微生物ゲノム研究の変貌 Microbial genomics for public health and clinical diagnosis.

くろ だ まこと
黒 田 誠
Makoto KURODA

キーワード

Next-Generation Sequencing, NGS、新興・再興感染症、不明症例、ゲノム分子疫学、結核菌、情報解析ツール、GoogleMaps

要 旨

次世代シーケンサー (NGS) は感染症分野の基礎と臨床研究のアプローチを抜本的に変え、ゲノム情報に基づいた分子疫学、進化系統解析はもちろんのこと、臨床分野ではNGSは感染症の起因病原体が不明の症例への対応として感度・特異性の高い包括的な病原体検査法としても活用されている。混合感染が疑われる症例であっても複数の遺伝型を塩基配列として確定できる利点があり、診断と治療方針をサポートする明解な検査データを提供できる。NGSで病原体の遺伝型がゲノムレベルで包括的に理解できるようになれば、各症例への診断・治療を超え、グローバルに伝播する病原体を俯瞰的に捉え包括的な感染症対策へと有益な分子疫学情報を提供できるだろう。

はじめに

次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencing : 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し効果的な検査法が汎用される時代へと近づきつつある。迅速

検査法と比べて経費面では高コストであることは間違いないが、その網羅性による守備範囲の広さは多様な病原体による感染症を把握するためには不可欠な技術であると言える¹⁻³⁾。NGSを利用した基礎・応用研究の進展はめざましく、昨今の症例報告においても汎用されつつあり、また数多くの情報解析アプリケーションが開発され、高度な感染症診断へと応用が期待されている。われわれはNGS技術が多方面で利用されやすい環境づくりが最重要と考え、NGS生データを迅速に情報解析するためのwebツール開発を進めている (図1)。新興・再興感染症がクローズアップされるたびに新規検査項目が増え煩雑化する傾向にあるが、NGSによるメタゲノム解析法は検体に内在する病原体配列まるごと解読するため、検査対象が増えようが塩基変異しようが感度・特異度に影響がないといっても過言ではない (図2)。仮に複数の病原体が病態に関与していても、NGS検査はその生物種と存在比を定量的に検出することが可能である。偏見なく病原体を検査できる核酸診断法であるため、1次スクリーニングとして適している。ただし、数日要するのと経費が未だ高額であるため、残念ながら現状では即活用できるシステムではない。今後の“次次”世代シーケンサー技術の飛躍的な進展に期待したい。

I. 不明症例の解明に應える NGS 検査法

臨床分野ではNGSは不明症例への対応として感度・特異性の高い包括的な病原体検査法としても有用であり、既存の検査プライマーに合致しない易変

複雑なNGS解析をクリックだけで可能に！

不明症例	メタゲノム 病原体検索ツール		https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic/index.cgi (JJID Vol. 67 (2014))
ウイルス	ウイルスゲノム アセンブルツール		https://gph.niid.go.jp/cgi-bin/virustap/index.cgi (Frontiers in Microbiol., 2016)
デング ウイルス	デングウイルスの WebMapツール		https://mepic.niid.go.jp/fever/content/genomemap (unpublished)
結核	結核菌の ゲノム分子系統解析		https://gph.niid.go.jp/tgs-tb/ (PLoS One. 2015 Nov 13;10(11))
炭疽菌	炭疽菌の ゲノム分子系統解析		https://gph.niid.go.jp/gcogsa/BA/index.html (Health Secur. 2015 Jan-Feb;13(1))

図1 著者が提供している病原体ゲノム情報を活用した
NGS 情報解析ツールの一覧

筆者作成

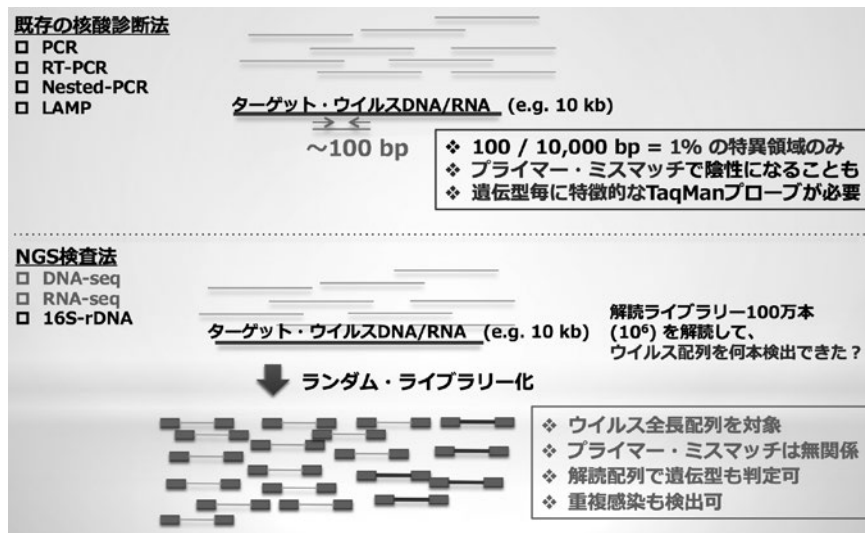


図2 NGS 検査法の特徴1

従来の核酸診断法は特異ターゲットの増幅・検出がメインであり、特異度が高いが網羅性が低い鑑別診断法である。NGS 検査法は研究開発途上であるため鑑別診断として確立された検査系ではないが、網羅性と高感度を特徴とし、解読配列を活用した遺伝型特定も可能にする配列検査法である。

筆者作成

異 RNA ウイルス等でも検出が可能になった。安価なシーケンサーや標準作業手順書の整備含め、全ての条件を整えば、“効率化・省力化・可用性の高い”病原体検査法として機能する日が近いと想定される。ウイルス血症を伴うウイルス種 (JC ウイルスやデングウイルス等) やウイルス性腸管下痢症 (ロタウイルス、ノロウイルス) では検体中のウイルス量が際立って多いことが特徴であり、当該病原体の特定と全ゲノム配列の取得は比較的容易な検査対象と思われる。一方、一般的な呼吸器ウイルス (ライノウイルス、メタニューモウイルス等) は咽頭拭い

液の全 RNA から ~ 0.001% 未満の存在比と非常に少ない症例が多く、断片的な配列が示すウイルス種と遺伝型にて起因病原体を推定する事例が多い。急性期検体であれば核酸診断は効果的であるが、回復期検体はむしろ抗体検査のほうが適しており、採取時期に適した検査法の適用が肝要であろう (図3)。

起因病原体が不確かな症例の NGS 検査の際、臨床検体に含まれる DNA/RNA の丸ごと網羅的解読が軸になっている。そのため、得られる配列の多くはヒト配列であり、非常に無駄が多い反面、漏れのない検査法として利点もある。しかしながら情報量が多い

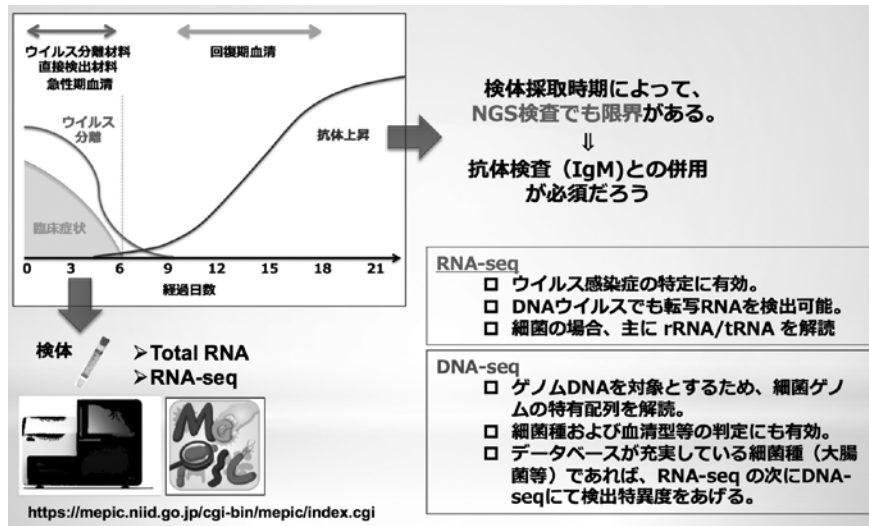


図3 NGS検査の特徴2

NGS検査は網羅・包括性を有した核酸診断法であるが、微生物検査は核酸診断(PCR, LAMP, NGS等)のみならず抗体価上昇の確認が重要であることを前提とする。発症から経過日数が超過し検体採取時期が不相当であった場合、NGS検査でも期待される結果を得られないことも念頭において検査すべきだろう。対象病原体の特徴によってDNAもしくはRNAのどちらを優先してNGS検査するのか検討すべき課題である。(メタゲノムNGS検査の情報解析パイプラインMePIC2 (<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic/index.cgi>))

ために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ある。それら一つ一つ解決すべく、われわれはNGS検査用のweb情報解析ツールMePIC2 (<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic/index.cgi>)⁴⁾を公開し、検査現場での有効活用を期待している。

現状、医師の診断に基づいた病原体検査が常であり、単独の検査キットの陽性・陰性に従って診断が下される。医師の診断所見と費用対効果を考慮して病原体検査の項目が選定されるが、全ての病原体を対象に検査するわけではなく、検査項目の選定によっては病態に直接関与する病原体を見過ごし、実際の確定診断に影響を与える可能性もある。それ故、できる限り包括的な結果をはじめ出す病原体検査が本来望ましいと考えられる。検査キットの感度・特異度が100%ではないことを理解していたとしても、キットが示す判定結果を信じるしかなく、病原体を見逃すケースは少なく無いであろう。われわれは急性脳炎で病原体が不明になった症例(5類感染症: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-03.html>)についてNGS検査で病原体の特定を遂行している。1例を挙げると、平成26年4月の関西地区で小児の不明

急性脳炎の髄液からNGS検査を遂行し、日本脳炎ウイルスの配列を検出した。急性期・回復期血清で抗IgM陽性との結果から、核酸診断と抗体検査の両輪で原因追求が行えた。春先の関西地区にて“日本脳炎ウイルス”による急性脳炎は事例が少なく、また髄液中にウイルス量が少なかったことも災いしPCR検査の判定が難しいケースだった。平成26年度は本事例を含めて計2例のみ日本脳炎ウイルスによる急性脳炎が報告されており、NGS検査で発見されなければ平成26年度の報告事例は“1例”になっていたであろう。

今後、NGS技術が病原体検査の“1次スクリーニング”として機能することは間違いないだろう。現状、費用対効果で壁は高いものの、医師は患者の実態を網羅検査データにて実像を理解し最適な診療と治療を施せる未来がそう遠くないと期待される。

II. NGSデータをゲノム情報として活用するツール

ゲノム情報は院内感染対策やグローバルな伝播の“追跡・トレーサビリティ”に有効であり、結核菌の市中伝播、MRSAの院内・市中・家族内アウトブ

レイク、流通食材による食中毒菌の追跡など実際のアウトブレイク対策に貢献している。従来の PFGE 等のバンドパターンによるプロファイリングでは個々のアウトブレイク事例における菌の同一性を評価する能力は優れている。しかし異なるアウトブレイク事例については、個々に行った PFGE の結果をもとに菌の同一性を判定するのは困難が生じる。それに比べ、NGS で得られる全ゲノム情報は固有の塩基変異 (Single nucleotide variations : SNVs) としてデジタル化が容易であり、データベースとして逐次集積することで、過去事例との比較解析がほぼ瞬時に遂行できる。また、ゲノム情報は時系列解析をもって進化速度の推定が可能であることから、PFGE よりも高分解能を示し、汚染食材等の原因追求で冤罪を生む危険性を排除できると考えられている (<http://www.cdc.gov/pulsenet/next-generation.html>)。

食中毒の原因食材の特定にゲノム情報が有効だった例を紹介する。サルモネラ関連のアウトブレイク状況と原因食材の一覧および報告が掲載されている米国 CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) の web サイトを参照願いたい。(<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>) 米国の広範囲にわたる複数州で、汚染された輸入黒コショウと赤コショウを使用したサラミ製品によるサルモネラ (*S. Montevideo*) アウトブレイクが発生した。2009 年 7 月から 2010 年 4 月までの 44 州の 272 人の発症が確認された。汚染食材と患者との因果関係は患者の聞き取り調査による喫食履歴を収集し、疫学的に推定食材を特定し、同一血清型のサルモネラが分離された。同一血清型の場合は PFGE による分解能では特定するには乏しく、汚染食材と患者との因果関係を明確に特定することが難しく、NGS によるゲノム分子系統解析の結果、約 20% がコショウに関連する食中毒であり、残りはコショウとは関連性のない食中毒事例であることが判明した^{5,6)}。これらの教訓から、米国 FDA/CDC にて食中毒菌のゲノム情報による追跡を行うための GenomeTracker プロジェクトが進行中である (<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/ucm363134.htm>)。

では、日本の感染症の現状を改めて考慮した際、ゲノム・データベースが優先的に構築されるべき対

象はなんだろうか？日本の結核感染症は中蔓延国として残念ながら望ましい感染制御はできていない。そこでわれわれは VNTR 解析の従来法が主軸となっている結核菌のゲノム分子疫学を高度化することを目的に、結核菌ゲノム分子疫学ツールを開発し (TGS-TB: <http://gph.niid.go.jp/tgs-tb>)、実地疫学を強固に補完するシステムを考案した (図 4)⁷⁾。タンDEMリポート数を指標にした VNTR 法が世界標準ではあるが、世界各国の研究グループから結核菌ゲノム情報が多数登録されるようになった昨今、全ゲノム情報を活用したゲノム分子疫学データのほうが高精度であると理解されるようになってきた。TGS-TB で分離株のゲノム SNVs を比較解析し、保健所へゲノム分子疫学データを提供して無駄のない疫学調査対象の選別を可能にした。

今後、NGS にてゲノム情報を予め取得しておくことは必須になっていくだろう。それを予感させる状況として、数個の遺伝子情報にて配列タイプを分類していた MLST 法による Sequence Type (ST) の

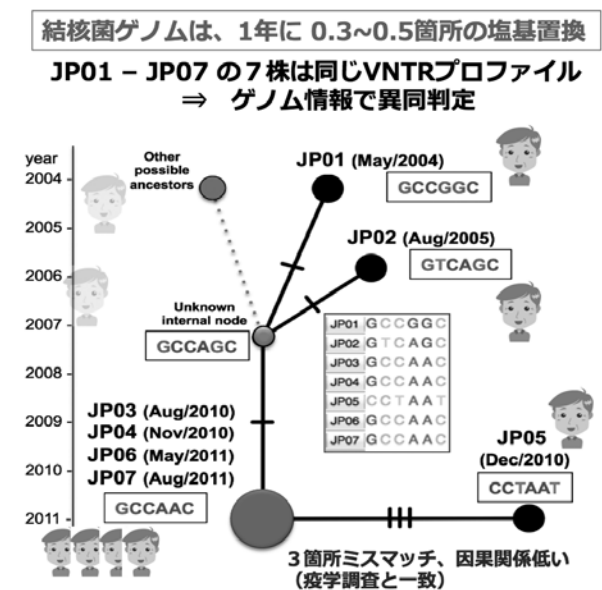


図 4 結核菌ゲノム情報を用いた感染伝播様式の情報解析パイプライン TGS-TB (<https://gph.niid.go.jp/tgs-tb>)

1 例として MIRU-VNTR 等の従来法では同一の遺伝型と判定された分離株 7 株 (JP01-07) のゲノム情報を取得し、TGS-TB で解析した結果の一部を紹介する。7 株間で 6 箇所の特有な塩基変異を検出し、従来法ではできなかった異同判定を可能にした。結核菌ゲノムは 0.3-0.5 塩基/年/ゲノムの変異速度を示すと算定されている。2011 年に分離された 5 株 (JP03, JP04, JP05, JP06, JP07) について、JP05 は 3 箇所の塩基変異を有したことから、残る 4 株のアウトブレイクとは関連性が低く、実地疫学からも因果関係が低いと示された。ゲノム分子疫学データは疫学調査を強く補完し、無駄のない調査を遂行するための貴重な情報源となりうる。

新規 ID 取得にはキャピラリー法による生データは受け付けず、NGSによる全ゲノム解読情報が義務付けられるようになりつつある (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>)。

病原体の全ゲノム情報が整備されデータベース化された次には仔細な塩基 SNVs での個別評価へと展開していこう。包括的な病原体ゲノムデータベースにより抽出されたユニークな配列のみターゲットにすればよいのである。PCR よりも高感度で迅速・簡便でかつベッドサイドで活躍が期待される遺伝子検査装置 Q-POC が高感度・特異度を有する 1 つの候補システムであろう (<http://www.quantumdx.com/index.html>)。ループ状回路を往復することで迅速に遺伝子増幅を行い SNPs 判定する特殊な遺伝子検査システムであり、血液採取から判定まで 15 分間で終了する優れたものである。マラリア、多剤耐性結核、性感染症病原体の検査キットも用意されている。多様な病原体のゲノム情報が整理されれば、感染症全般において正確なベッドサイド診断を補助できると期待が高まる。

Ⅲ. 病原体情報を指標にした地図マッピング

感染症のグローバルな伝播を把握するためには当該病原体の遺伝型 (Genotype) 特定は先決であり、感染症対策を迅速に立案することにも貢献する。海外からの来訪者が増えつつある日本において、2014 年夏のデングウイルスの国内症例を経験した今、病原体の由来特定は重要になってきている。危機管理対応として被害を最小限に留めるためにはアウトブレイクの汚染源の特定は必須である。それ故、出来る限り検出された病原体の遺伝型特定は行っておきたい。そこでわれわれはデングウイルス配列 (1944-2015 年) を公開データベース NCBI から収集し、分離国・血清型・遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるよう Dengue Genographic Viewer (DGV) を公開している (図 5)。遺伝型 (Genotype) を図示化 (Graph) し、俯瞰的に状況を把握しやすくする手法である。例として血清型 3 を提示しているが、一目瞭然、東南アジア地域では

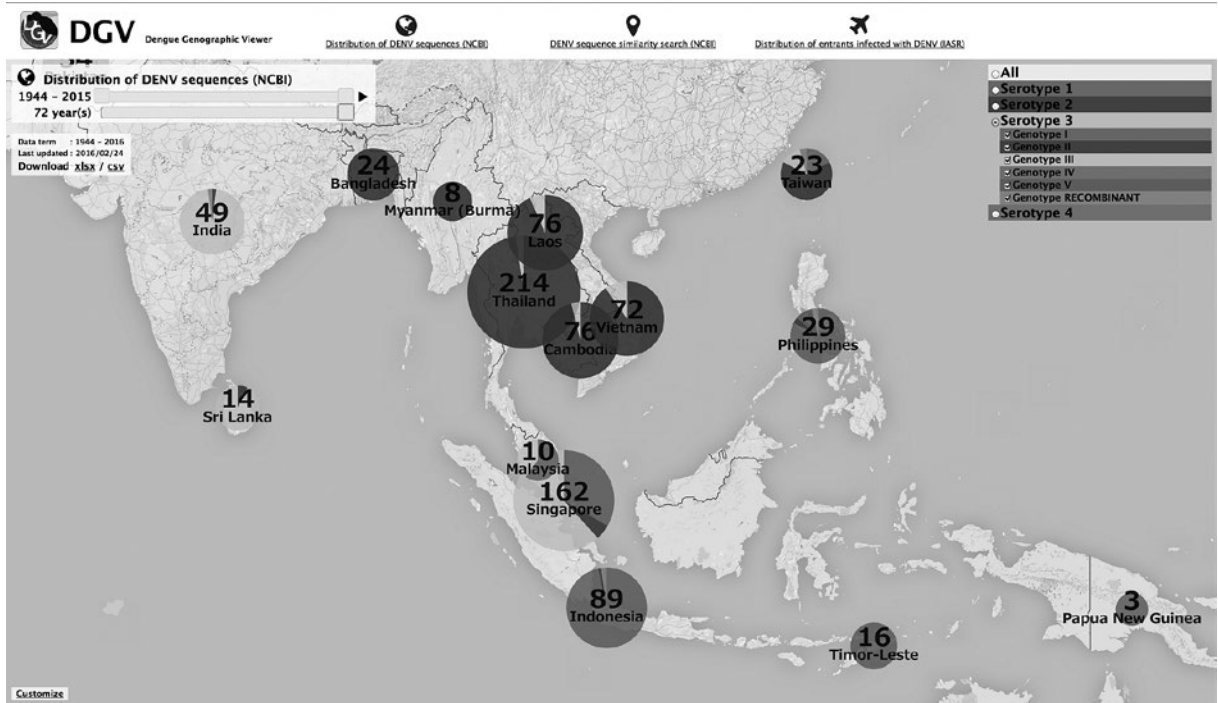


図 5 デングウイルス配列 (1944-2015 年 : 71 年間) の分離国・地域と血清型および遺伝型データベース (図では血清型 3 の遺伝型分布のみ表示)

Genotype I はインドネシアより東地域に有意であり、Genotype II はタイ、カンボジア、ベトナムで有意、Genotype III はインドで有意、それら地域の合流点と目されるシンガポールでは混合型になっている。つまり東南アジアでは地域に特化した遺伝型が優位に検出されていることが示唆された。(サイト公開済み : <https://mepic.niid.go.jp/fever/content/genomemap>)

ある固有の遺伝型が特徴的な分布を示している。そもそもデングウイルスは蚊媒介性感染症であり、中間宿主の蚊の種類を生息域に制限されることが主因として推測される。他の蚊媒介性のチクングニヤウイルスやウェストナイルウイルスやジカウイルスの Genograph Viewer も開発すれば、蚊を媒介する感染伝播様式を深く理解しやすく、感染症対策の立案にも貢献できるものと期待している。

世界的に重要な感染症の発生動向および関連情報を包括的に地図化しているツール HealthMap を紹介したい (<http://www.healthmap.org/en/>) (図 6)。個別の病原体および感染症の発生状況や関連情報を入手することができ、地図を閲覧しながら俯瞰的に状況把握することができる。ジカ熱感染症が世界規模の問題となりつつあるが、アメリカ大陸全般で報告が多いことやベクター蚊の生息域との比較、近隣諸国での報告事例の検索にも有用なサイトである (図 7)。

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) の世界的伝播と

治療薬の無い未来へのリスクが懸念されている (WHO Global action plan 参照 : http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/)。これらリスクを啓蒙するためにも HealthMap は効果的な情報提供を行っている (<http://www.healthmap.org/resistanceopen/results/>) (図 8)。若干、実情と異なる数字のようであるが、薬剤耐性菌の検出・報告数を収集し、世界各国との比較結果から耐性菌汚染の実情を閲覧でき非常にインタラクティブである。

New York の地下鉄の拭き取り調査により得られた検体のメタゲノム DNA 解析し、多種多様な細菌種を同定し、地図上にマップする試みが行われている (図 9) (<http://graphics.wsj.com/patho-map/?sel=bact>)。NY にとどまらず、世界的な取り組みとしてコーネル大学 Mason 博士の主催の元、Metagenomics & Metadesign of Subways & Urban Biomes (MetaSUB) プロジェクトが進行中である。都市における感染リスクをゲノミクスを駆使して評価しており、環境保全等の基盤データとして有効かも知れない。

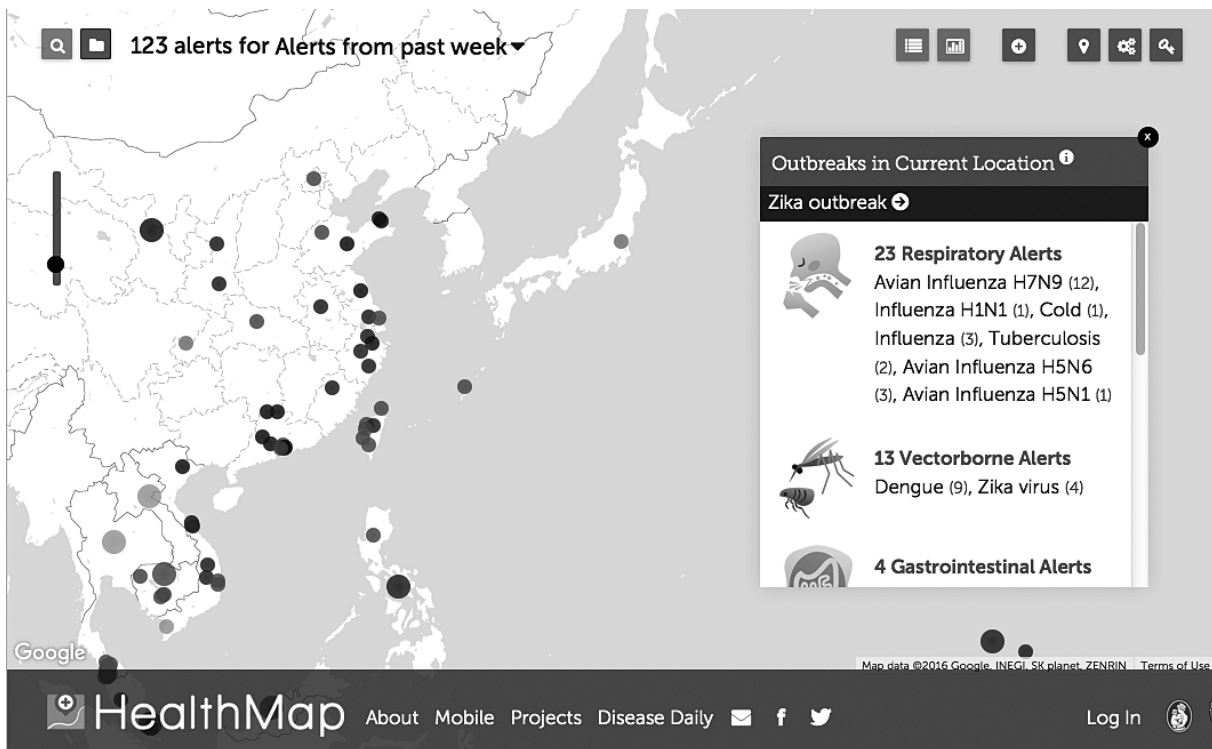


図 6 各種病原体による発生状況を地図化した HealthMap (<http://www.healthmap.org/en/>)

選択した病原体および感染症の発生状況や関連情報を入手することができ、地図を閲覧しながら俯瞰的に状況把握することができる。

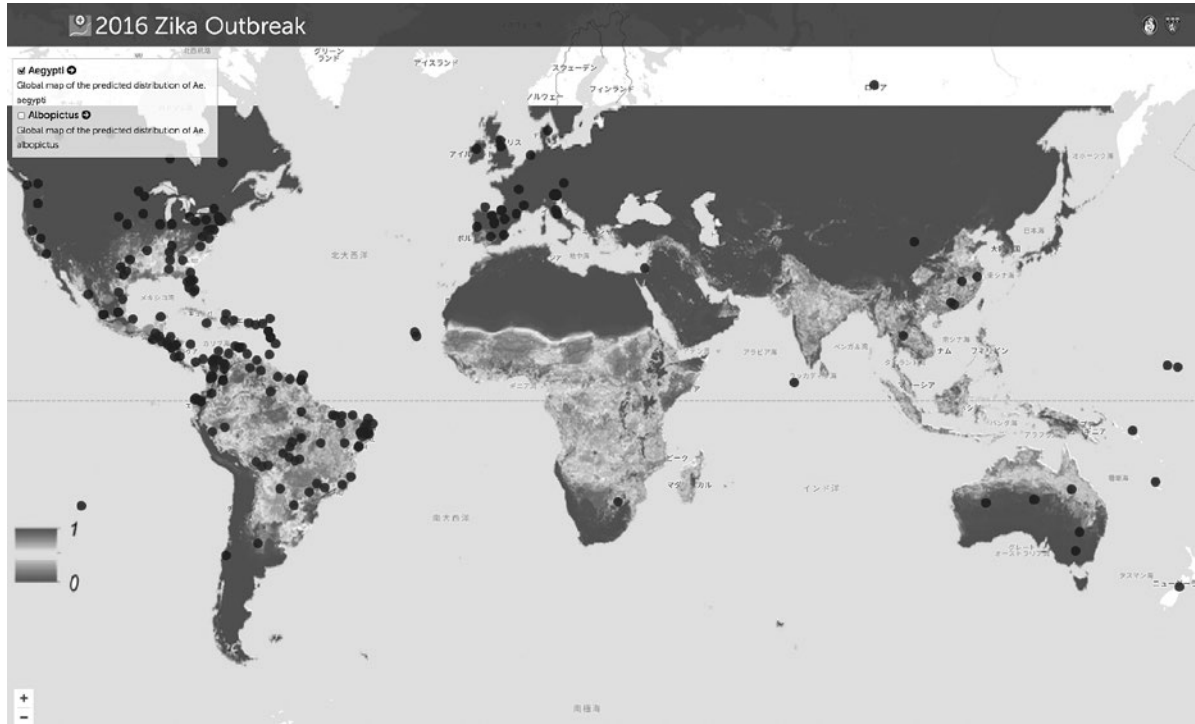


図7 ジカ熱感染症の発生状況のマップ (2016年2月末現在)
 (<http://www.healthmap.org/zika/#timeline>)

●は報告事例を示し、アメリカ大陸全般で事例報告が多いことが理解できる。ベクター蚊 *Aegypti* の生息範囲も同時に濃淡で比較できるようになっている。近隣国では中国で2016/2/9に中国で初のジカ熱感染者(南米旅行者)の報告があった。

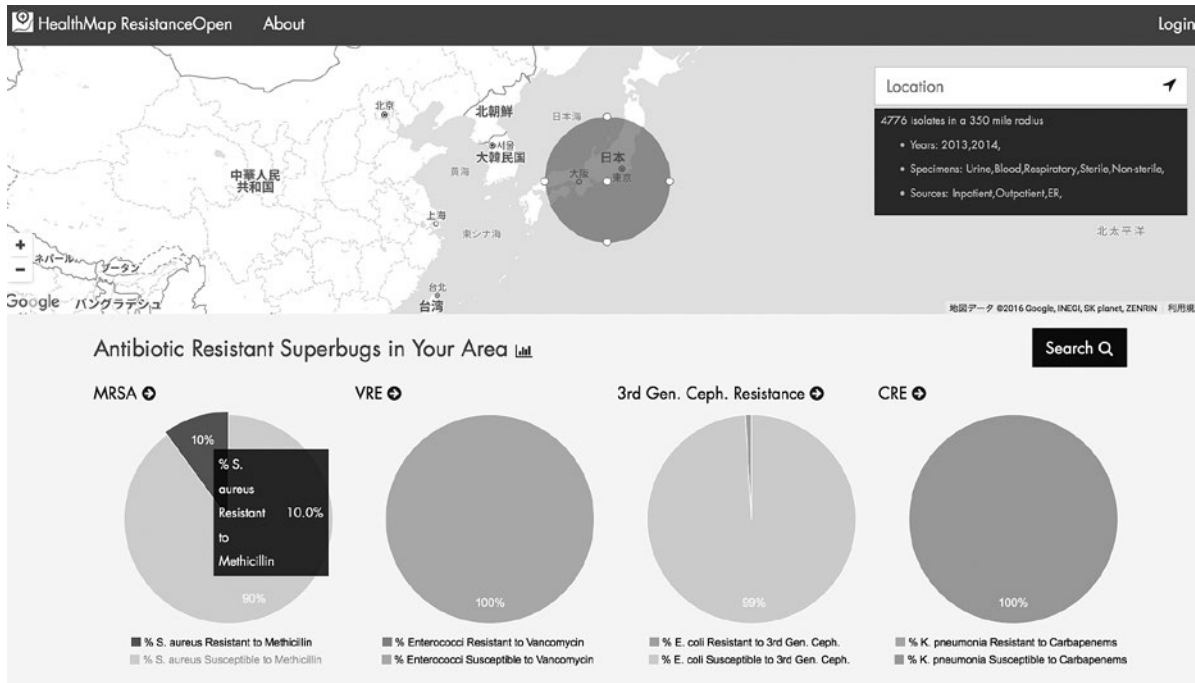


図8 HealthMap の ResistanceOpen
 (<http://www.healthmap.org/resistanceopen/results/>)

薬剤耐性菌の検出・報告数を収集し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE、第三世代セファロスポリン耐性大腸菌、カルバペネム耐性肺炎桿菌に絞って円グラフで図示化している。例では日本を選択しており、2013、2014年の4776株の情報からMRSAが10.0%の検出率となっている。若干、現実よりも低い%の印象で信用度は低いものの、世界各国との比較結果を閲覧でき非常にインタラクティブである。

Mapping the Bacteria in New York's Subways

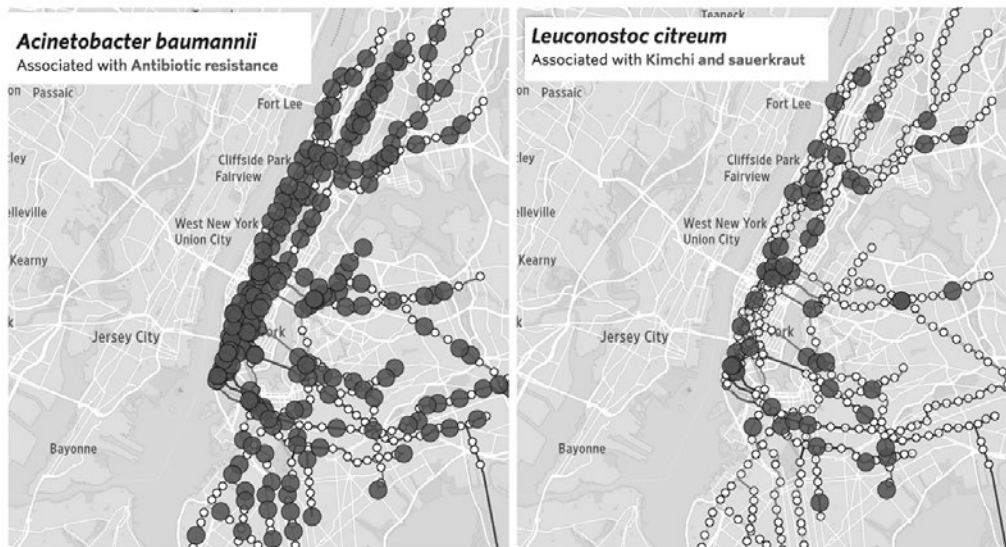


図9 MetaSUB: Metagenomics & Metadesign of Subways & Urban Biomes

New York の地下鉄の拭き取り調査により得られた検体のメタゲノム DNA 解析し、多種多様な細菌種を同定し、地図上にマップしたイメージ (<http://graphics.wsj.com/patho-map/?sel=bact>)。薬剤耐性菌として知られる *Acinetobacter* と発酵食品由来の *Leuconostoc* が検出された駅を图示している。

おわりに

ゲノム情報は病原体の種・遺伝型・薬剤耐性・病原性といった複合的な情報を一度に提示してくれる上、可用性・継続性の高い情報源である。ただし、“NGSで新規（未知）病原体の発見が容易に！”と思われている節があるが、それは候補の探索であって病原体と規定するには更なる実験・疫学調査が必須である。病原体分離は重要であり、分離できない場合でも抗体価 (IgM, ペア IgG) の上昇は確認したい検査項目である。NGSを1次スクリーニングに適用できるのであれば検査対象を絞りこむことができ、分離・抗体検査へのステップへ無駄のない道筋・手順を示してくれるだろう。

高度な病原体検査は医師の診断・診療をより適切にサポートする最初のステップである。しかしながら、病原体を迅速にかつ的確に特定できたとしても、患者固有の感染症に対する“感受性”が重篤化に影響を与えることがある。事実、これまでの論文発表においても結核菌感染への免疫応答⁸⁾、腸チフスの発症リスク⁹⁾、MMR 3種混合ワクチンによる熱性痙攣¹⁰⁾、ヒトパピローマウイルス感染とゲノム

挿入による子宮頸がん発症¹¹⁾としてヒト固有のリスク因子が特定されている。今後、病原体とヒトゲノム情報とさらに疫学情報が融合したビッグデータの活用が促進されれば、様々な感染症診断・対策において包括的なセーフティネットとして貢献できると期待される。

文 献

- 1) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, et al. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One* 2010 ; 5(4): e10256.
- 2) Kuroda M, Sekizuka T, Shinya F, et al. Detection of a possible bioterrorism agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen by use of next-generation direct DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2012 ; 50(5): 1810-1812.
- 3) Ching PK, de los Reyes VC, Sucaldito MN, et al. Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015 ; 21(2): 328-331.
- 4) Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, Ogasawara Y, Mizuta K, Kuroda M. MePIC, metagenomic pathogen identification for clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* 2014 ; 67(1): 62-65.
- 5) Lienau EK, Strain E, Wang C, et al. Identification of a salmonellosis outbreak by means of molecular sequencing. *N Engl J Med* 2011 ; 364(10): 981-982.

- 6) Bakker HC, Switt AI, Cummings CA, et al. A whole-genome single nucleotide polymorphism-based approach to trace and identify outbreaks linked to a common *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo pulsed-field gel electrophoresis type. *Appl Environ Microbiol* 2011 ; **77**(24): 8648-8655.
- 7) Sekizuka T, Yamashita A, Murase Y, et al. TGS-TB : Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. *PLoS One* 2015 ; **10**(11): e0142951.
- 8) Barreiro LB, Tailleux L, Pai AA, Gicquel B, Marioni JC, Gilad Y. Deciphering the genetic architecture of variation in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; **109**(4): 1204-1209.
- 9) Dunstan SJ, Hue NT, Han B, et al. Variation at HLA-DRB1 is associated with resistance to enteric fever. *Nat Genet* 2014 ; **46**(12): 1333-1336.
- 10) Feenstra B, Pasternak B, Geller F, et al. Common variants associated with general and MMR vaccine-related febrile seizures. *Nat Genet* 2014 ; **46**(12): 1274-1282.
- 11) Hu Z, Zhu D, Wang W, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet* 2015 ; **47**(2): 158-163.