

[総 説]

臨床微生物検査における NGS 活用の展望

嵯峨知生^{1) 2)}

¹⁾ 秋田大学医学部附属病院感染制御部

²⁾ 秋田大学医学部附属病院中央検査部

(令和2年11月9日受付)

次世代シーケンサ (Next-generation sequencer, NGS) は、桁違いのデータ量と網羅性を持ったスループットの高い最上位の遺伝子解析技術である。近未来の感染症診療には NGS の活用が期待され、NGS は診断、治療、制御の各局面で新たな地平を切り拓くことが期待されている。本稿では NGS の微生物検査における活用とその課題と解決について展望する。

Key words: 次世代シーケンサ (Next-generation sequencer, NGS), 感染症診断, 感染症治療, 感染制御, 適正診断支援 (Diagnostic Stewardship, DS)

はじめに

次世代シーケンサ (Next-generation sequencer, NGS) はがんゲノム医療における遺伝子パネル検査をはじめとした医療現場での実際の活用が始まりつつある。感染症診療領域においても NGS は近未来の遺伝子診断の中核を担うことが期待される¹⁾²⁾。本稿では、NGS が感染症診療を今後どのように変えることが期待されるかを展望したい。

NGS とは

NGS とは、サンガー法に代表される従来の塩基配列解析法よりも桁違いにスループットが高い、新しい世代の塩基配列解析装置の総称である。方法論はいくつかあり、世代分類で整理される場合もあるが、本稿では NGS を従来の遺伝子解析技術の最上位に位置付けられるものの総称として扱う。

NGS の第一の特長は、データ量が莫大であることである。従来法の塩基配列解析法では全ゲノム塩基配列解析は現実的ではなかったが、NGS の登場で状況は一変した。また、従来法では一つの部位についての情報は1つ~少数しか得られないのが通常であったところ、NGS では同一部位について厚みのある情報が得られるため、わずかにしか存在しない変異についても高い精度で評価することが期待できる。一度に複数検体を解析対象とするマルチプレックス化を行うことで NGS の1回のランを効率よく活用することが可能である。その反面、データ数が膨大すぎることは、従来のようにデータを目視や手作業でハンドリングすることが不可能であることを意味する。NGS の結果はリード長が短いデータが膨大な数存在するのが典型的であり、解釈可能なデータを得るため

にはバイオインフォマティクスによるデータ処理・解析が必要である。ウェット (wet) の実験作業と並んでデータ処理・解析のドライ (dry) の作業が占める割合が大きく、その作業ノウハウは従来法の遺伝子解析とは大きく異なる部分がある。

NGS のもう一つの特長には網羅性が挙げられる。遺伝子解析は、培養に基づく従来からの微生物検査と比較して、微生物が培養可能かどうかを問わないのも大きな利点であった。NGS についてもそれは当てはまる上、活用法によっては従来法の遺伝子解析の制約や前提からも解放される。解析対象の遺伝子の数が多い場合、NGS でドラフト全ゲノム塩基配列を得た上で目的遺伝子の塩基配列を拾い上げるほうが、従来法で目的遺伝子を個別に PCR 増幅して塩基配列解析するのよりも効率がよい場合がある。あるいは、ユニバーサルプライマを用いた16S リボソーム RNA 遺伝子の PCR 増幅産物はマイクロバイオーム解析によく活用されるが、解析対象はユニバーサルプライマが増幅可能な細菌の塩基配列に限られるため、細菌以外の評価には無力である。これに対して NGS では、特異的プライマによる PCR 増幅を経ずに、検体に存在する核酸を網羅的に解析対象とすることができるため、事前に想定していない生物種の核酸も検出できる可能性がある。一方、その網羅性が裏目に出た場合、従来は問題とならなかった程度の試薬・キットのコンタミネーション、装置のキャリーオーバー等が解析の支障となる場合がある³⁾。

NGS のワークフロー

NGS は様々な活用が精力的に開発されている。以下は Illumina MiSeq を用いたドラフト全ゲノム塩基配列解析およびショットガンメタゲノム解析のワークフローの一例である。

まず、解析対象となる核酸を抽出する。ドラフト全ゲノム塩基配列解析の場合は分離培養された菌株から、ショットガンメタゲノム解析の場合は臨床検体そのものから、それぞれ抽出する。抽出した DNA を NGS で解析可能な大きさに断片化して NGS にアプライするライブラリを調整する。Illumina

著者連絡先：(〒010-8543) 秋田市広面字連沼 44 番 2
秋田大学医学部附属病院感染制御部
嵯峨知生
TEL: 018-884-6248
FAX: 018-884-6209
E-mail: sagatomoo@gmail.com

表1. 感染症診療における NGS の活用場面

(1) 診断	・分離菌ゲノム解析での菌種同定・病原性評価 ・メタゲノム解析での検出
(2) 治療	・抗菌薬耐性の検出, 薬剤感受性評価
(3) 制御	・系統解析, 伝播経路推定

mina Nextera XT DNA Library Prep Kit はトランスポゾンを利用した DNA 断片化とマルチプレックスに対応したインデックス配列の付与をサーマルサイクラで行うことができる。調整したライブラリを Illumina MiSeq にアプライして結果を得る。得られる結果は膨大な数の短いリードの塩基配列である。トリミング等の処理を行った上で、リードそのものを参照配列に突き合わせてマッピングを行って塩基多型を抽出したり、塩基配列データベースと照合して塩基配列が由来する生物種を推定したりすることができる。あるいは、アセンブルを行って、リード同士の相同性が高い部分を重ね合わせて生成されるコンセンサス配列である contig を得て、位置関係を踏まえて contig を連結した scaffold を得ることができる。

感染症診療における NGS の活用

NGS による微生物ゲノム解析およびメタゲノム解析は感染症診療の新たな地平を切り拓くことが期待される。近い将来 NGS の活用が抗菌薬耐性菌の感染症診療にもたらしうる変化を診断、治療、制御の観点で整理する (表1)。

感染症診断：原因微生物の検出・同定

感染症は微生物によって起こる疾病であるため、感染症の原因微生物を同定することは決定的に重要である。臨床検体からすでに細菌が分離されているならば、そのゲノム解析によって、菌種の正確な同定が可能である。従来法による塩基配列解析で菌種推定を行う場合、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列は相同性が高すぎて種レベルの同定には適さない⁴⁾。rpoB などの他のハウスキーピング遺伝子の塩基配列は参照データベースが必ずしも十分整備されていない。細菌の場合、DNA-DNA hybridization (DDH) 試験による DNA 配列の相同性が 70% 以上であれば同菌種と判断されるが、この基準はゲノム塩基配列の ANI (average nucleotide identity) での相同性 95-96% に相当する⁵⁾。これによって NGS で得たゲノム配列から確かな菌種同定が可能である。菌種以外にも、ドラフト全ゲノム塩基配列解析で病原遺伝子の保有の有無を評価することで病原性を評価することも期待される。

一方、メタゲノム解析とは分離培養を経ずに検体中の核酸を網羅的に解析する手法である⁶⁾。16S リボソーム RNA 遺伝子の PCR 増幅産物のメタゲノム解析はマイクロバイーム解析に汎用されるが、解析対象は細菌のみに限定され、上述のように分類学的な解像度にも制約がある。これに対して、検体に含まれる全ての核酸を網羅的に解析するショットガンメタゲノム解析では、ノイズ・コンタミネーションを考慮する必要はあるものの、事前の想定を要さない遺伝子診断につながる可能性があり、従来法では診断困難な未知の病原体が検出・同定されることが期待される⁷⁾。

表2. ゲノムからみた抗菌薬耐性菌

[A] 耐性機序	(1) 薬剤-標的の結合低下 (2) 菌体内の薬剤濃度低下 (3) 薬剤分解/修飾
[B] 耐性化機序	(1) 内在性遺伝子の変異 (2) 外来性遺伝子の獲得 (a) 形質転換 (b) 接合伝達 (c) 形質導入
[C] 耐性菌の成り立ち	(1) 抗菌薬を投与された患者体内での耐性菌の選択 (2) 世界流行系統：すでに耐性化した系統が地域を越えて伝播

ただし核酸検出の臨床的意義については、臨床上の文脈とも照らし合わせて慎重に解釈される必要がある。そこに核酸が存在することが、生きた微生物の存在やその感染性・病原性を必ずしも意味しないことは、従来法の遺伝子解析の解釈上の留意点とも共通する。

感染症治療：薬剤耐性/感受性

感染症治療については、抗菌薬耐性の検出や薬剤感受性評価が焦点となる。

2016年に内閣府から出された AMR (薬剤耐性) 対策アクションプランでは抗菌薬適正使用支援 (Antimicrobial Stewardship, AS) の重要性が強調され、「薬剤耐性の研究や、薬剤耐性微生物に対する予防・診断・治療手段を確保するための研究開発を推進する」ことも目標の一つに盛り込まれている。耐性菌の発生およびその拡がりを遺伝子レベルで整理しておくことは、最上位の遺伝子解析技術である NGS で得られる知見を根本的な耐性制御につなげていくことへの前提となる。以下に、細菌の抗菌薬耐性を、抗菌薬耐性機序および耐性化機序に整理する (表2)。

細菌の抗菌薬耐性の耐性機序は以下の3つに大別される⁸⁾⁹⁾。一つ目に、抗菌薬が細菌に選択毒性を発揮するための標的が変化または保護されることが挙げられる。標的分子が変異したり、薬剤の影響を受けにくい標的分子の遺伝子を獲得して発現したりすることは、高度耐性につながる場合がある。二つ目に、薬剤透過孔の発現低下・欠損やエフラックス機構によって菌体内の薬剤濃度が低下する。耐性度上昇はそれほど大きくない場合もあるが、複数のクラスの薬剤への感受性を低下させ、多剤耐性化に寄与する場合がある。三つ目に、薬剤を分解または修飾する酵素が産生されて抗菌薬の活性が低下・消失する。耐性化は高度である場合が多く、菌量や酵素発現量が多い場合は臨床的に耐性のインパクトがさらに大きくなる場合もある。

一方、抗菌薬耐性菌の成り立ちの観点から耐性化機序を整理すると、内在性遺伝子の変異と外来性遺伝子の獲得とに大別できる。前者は、細菌がもともと保有している染色体上の遺伝子に変異が生じることを指す。後者には、菌体外から外来性遺伝子を取込んで組換え等によって獲得する形質転換、

表 3. 耐性の性質からみた遺伝子解析の難易

遺伝子解析	容易	困難
耐性機序	・単一・少数	・複雑・多様
存在/変異の耐性への意義	・明瞭, 耐性と直結	・不明瞭, 耐性と直結せず
臨床上問題となる	・単一・少数系統	・多系統
耐性菌の遺伝的背景	世界流行系統の伝播	患者体内で容易に耐性化

伝達性プラスミドの獲得を介した接合伝達, フェージを介した形質導入がある。他にも, トランスポゾンや挿入配列等が耐性遺伝子の水平伝播をより複雑なものにしている。臨床現場では抗菌薬の選択圧が高いため, 多剤耐性菌が選択されやすい環境であると言える¹⁰⁾。プラスミドの伝播は菌種をまたぐ場合もあり, 一つのプラスミド上に多くの耐性遺伝子が存在する場合も多い¹¹⁾。このため遺伝子の水平伝播には, 多剤耐性が菌種を越えて速やかに拡散してしまうリスクがある。

最後に, 耐性菌の拡がりには, 耐性菌自体が直接伝播することも重要である。耐性菌は従来, 抗菌薬を投与された患者体内で選択されて出現するものと想定されていた部分がある。しかし近年のゲノム解析の知見の蓄積によって, すでに耐性化した系統が地域を越えて伝播している場合があることが明らかにされつつある¹²⁾¹³⁾。「世界流行系統」とも呼ぶべきこれら耐性菌の伝播経路は現時点で未解明点が多いものの, 世界流行系統については, 耐性に直接寄与する因子の検出以外でも, その系統の遺伝的背景を検出することで耐性菌の存在を推定できる場合がある。

従来の遺伝子解析技術による抗菌薬耐性菌診断にも共通するが, 耐性機序が単一または少数で, 耐性遺伝子の保有や耐性化変異の存在と表現型における耐性との関連が堅固で, 臨床現場で分離される耐性菌の遺伝的背景が単一または少数である場合に, 遺伝子解析による耐性菌検出は比較的容易である(表3)。

NGSによるゲノム解析では, 外来性の耐性遺伝子の保有の有無の評価が比較的早い段階に実装され, 主要菌種については内在性遺伝子の変異検出もカバーされつつある。耐性遺伝子周囲の構造を比較することで遺伝子水平伝播の過程を推測することがある程度は可能である場合がある。

しかし薬剤感受性は現時点でも表現型による評価が標準とされる。NGSによる細菌ゲノム解析が表現型による薬剤感受性測定に取って変わる日は来るのだろうか。欧州抗菌薬感受性試験法検討委員会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)がNGSによる薬剤感受性推定の現状と課題をまとめており, 一部で有望な結果は得られているものの, 根拠や検証が不十分な段階であると結論づけられている¹⁴⁾。臨床の観点から重要なのは, 結果が単に一致するか否かのみではない。耐性の見落としは Very Major Discrepancy に相当し, 効果が期待できない薬剤を選択してしまうことを意味するため, 臨床検査の現場で NGS の活用を考えた場合に特に重要視される。

感染制御: 系統解析/伝播経路推定

遺伝子型別法は表現型よりも信頼できるタイピング法として感染制御に活用されてきた。パルスフィールドゲル電気泳

動(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)法は微生物ゲノムDNAを制限酵素切断したバンドパターンによる型別法で, 識別能が高いためアウトブレイク評価等に威力を発揮してきた。一方, 塩基配列解析に基づく Multi-locus sequence typing (MLST) 法は, 識別能は PFGE 法に劣るものの, 結果の比較が容易であるため, 時空を超えた菌株の比較に威力を発揮し, 系統の推定に用いられてきた。

NGSでは全ゲノム塩基配列を解析対象にすることができ, 原理的に最も解像度の高い遺伝子型別が可能である。MLST法の解析対象は7遺伝子・約3000塩基対である場合が多かったが, これをゲノム遺伝子全体に拡張した cgMLST (core genome MLST) や wgMLST (whole genome MLST) が提案されている。また, 一塩基多型を参照配列へのマッピングで抽出して系統を推定することも行われている。これらの手法によってより正確な伝播経路の推定や未知の伝播経路の解明に期待が寄せられている。

課題とその解決に向けて

現状の NGS には課題も多い¹⁵⁾。NGSの進歩は日進月歩であるため, 技術面については, 長い目で見た場合には解決は時間の問題と考えられる。リード長が短い, 解析時間が長いという NGS の弱点には克服されつつある部分もあり, 長期的には解析コストも下がることが期待される。従来の遺伝子解析法による遺伝子診断とは質・量ともに異なる NGS の大量のデータ解析にはバイオインフォマティクスのノウハウを要し, ユーザーインターフェースの改良が進んで臨床家がより理解しやすい結果が容易に得られる環境が整備される必要がある。臨床検査としての成熟のためには, 信頼性の高いデータベース整備, 精度管理および質保証も, 重要な技術的課題である。

一方, NGSの活用を感染症診療のツールの一つとして確立させるために真に重要なのは, NGSで得られたデータとその臨床的意義とをすり合わせて丁寧に検証することであろう。NGS技術を微生物検査に成熟させ, 感染症診療の現場での実用につなげていくには, 臨床家の力が不可欠である。

おわりに

感染症診療領域では現在, 適正診断支援(Diagnostic Stewardship, DS)の重要性が強調される機会が増えている¹⁶⁾。アカデミア・臨床家および産業界が共同して技術発展を適切な方向に導きながら, NGSによる次世代の微生物検査, 感染症診療が実現することを祈念したい。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Didelot, X., R. Bowden, D. J. Wilson, et al. 2012. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 13: 601-612.
- 2) Besser, J., H. A. Carleton, P. Gerner-Smidt, et al. 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 24: 335-341.
- 3) Salter, S. J., M. J. Cox, E. M. Turek, et al. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 12: 87.
- 4) Kim, M., H. S. Oh, S. C. Park, et al. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 346-351.
- 5) Richter, M., R. Rosselló-Móra. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19126-19131.
- 6) Simner, P. J., S. Miller, K. C. Carroll. 2018. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 66: 778-788.
- 7) Kawai, T., T. Sekizuka, Y. Yahata, et al. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis* 54: 1046-1052.
- 8) Saga, T., K. Yamaguchi. 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Jpn Med Assoc J* 52: 103-108.
- 9) 嵯峨知生, 山口恵三. 2008. 【難治性・耐性菌感染症の克服に向けて】薬剤耐性のメカニズム. *Mebio* 25: 20-31.
- 10) Cantón, R., P. Ruiz-Garbajosa. 2011. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 11: 477-485.
- 11) Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2227-2238.
- 12) Nicolas-Chanoine, M. H., X. Bertrand, J. Y. Madec. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27: 543-574.
- 13) Kashiwaya, K., T. Saga, Y. Ishii, et al. 2016. Worldwide lineages of clinical pneumococci in a Japanese teaching hospital identified by DiversiLab system. *J Infect Chemother* 22: 407-413.
- 14) Ellington, M. J., O. Ekelund, F. M. Aarestrup, et al. 2017. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect* 23: 2-22.
- 15) Rossen, J. W. A., A. W. Friedrich, J. Moran-Gilad. 2018. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect* 24: 355-360.
- 16) Messacar, K., S.K. Parker, J.K. Todd, et al. 2017. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J Clin Microbiol* 55: 715-723.

Prospects of Application of Next-generation Sequencer for Clinical Microbiology

Tomoo Saga^{1) 2)}¹⁾Division of Infection Control and Prevention, Akita University Hospital²⁾Central Laboratory Division, Akita University Hospital

Next-generation sequencer (NGS) is a high-end high-throughput technology device for genetic analysis with an incomparably huge output and exhaustiveness compared with the conventional sequencing technology. Utilizing NGS in the clinical laboratory is expected to open a new horizon for diagnosis, therapy, and infection control in near future. In this review, prospects and challenges in using NGS for clinical microbiology are discussed.