

全ゲノム解析データは微生物検査に落とし込めるのか

◎青木 弘太郎¹⁾東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座¹⁾

次世代シーケンサー (NGS) は旧世代のシーケンサーに比較して大量の塩基配列を安価に解読できる装置である。最大の特徴は解読標的部位を指定する必要がないことである。網羅的に解読された解析対象のゲノムデータについて、公共塩基配列データベースの情報を参照しながら、興味のある遺伝子や変異の有無などを解析することができる。NGS はショートリードシーケンサーとロングリードシーケンサーに大別される。前者はイルミナ社 NGS がシェアのほとんどを占めており、後者は Pacific Biosciences 社およびオックスフォード・ナノポアテクノロジーズ (ONT) 社の NGS が該当する。Pacific Biosciences 社の NGS は精度高いロングリードを出力する。ONT 社の NGS はリード長が最も長いものの解読精度にやや問題を抱えている。しかし、製品性能の向上は著しく、年々、解読精度が向上し続けている。これらの NGS は目的によって使い分けられる必要がある。

感染症の診断のための病原体検出法としては、NGS を用いたメタゲノム解析が威力を発揮する。メタゲノム解析の対象は細菌、真菌、ウイルス、および寄生虫の分類によらない。これまで、メタゲノム解析はイルミナ社の NGS を中心に研究的に実績が積まれてる。ONT 社の NGS もメタゲノム解析に活用されつつある。メタゲノム解析は網羅的に病原体ゲノムを検出できる一方で、試料や試薬の標的病原体以外による汚染が問題となる。検査としてメタゲノム解析を活用するには、結果の解釈について経験や共通認識を蓄積していく必要がある。

微生物検査における菌株の全ゲノム解析は、菌種同定、薬剤耐性遺伝子網羅検出による薬剤感受性予測、病原遺伝子解析、アウトブレイク解析、および疫学解析などに威力を発揮する。近年、全ゲノム情報に基づいた菌種同定により、多くの新種提案がなされている。薬剤耐性遺伝子の解析にはトランスポゾンやプラスミドといった可動性遺伝子の解析が重要であるが、それを実現するにはロングリードシーケンサーのデータが必須である。一方で、ショートリードシーケンサーのデータがあれば、分子疫学的には十分である。院内伝播が疑われる菌株間の遺伝的関連を全ゲノムレベルで一塩基多型に基づいて評価できる。

NGS の日常検査への活用のハードルの 1 つに、Turn Around Time (TAT) の長さがある。NGS 解析のワークフローは、核酸抽出、ライブラリ調整、NGS 運転による解読、情報解析、解釈、報告である。NGS 運転前のサンプル調整はキット化されているものの、PCR 検査より長いハンズオン時間を要する。NGS 運転時間は機種や目的によって異なるが、イルミナ社の NGS は 1~2.5 日を要する。現時点で、情報解析はいくつかのフリー解析ツールを組み合わせたパイプラインが想定されるが、高性能な計算機かつコマンドラインによる操作を要する。さらに結果の解釈は簡単ではなく、期待しない病原体が検出された場合、臨床情報を踏まえた個別の議論や文献検索が必要である。

演者らのグループでは、日常検査に NGS を落とし込むため、ハンズオン、解読、情報解析部分の高速化から取り組んでいる。具体的には、血液培養陽性ボトルの培養液を出発材料に、簡易的な DNA 精製およびライブラリ調整を行い、ナノポアシーケンサーによるリアルタイム解析を行うプロトコルである。サブカルチャー、ハンズオン、解読、解析に要する時間をそれぞれ短縮し、検査開始から 6 時間以内の報告を目指している。本プロトコルが日常検査で実施可能になれば、迅速な菌種同定および薬剤耐性予測の実現による感染症治療への貢献ならびに院内伝播のモニタリングによるアウトブレイク迅速察知が可能になる。本講演では、NGS による臨床微生物検査へ応用されるアプリケーションを紹介し、今後の展望および日常検査に落とし込むためのハードルについて、情報やアイデアを共有しつつ議論出来れば幸いである。

e-mail: kotaro.aoki@med.toho-u.ac.jp