

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

研究代表者 黒田 誠（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）
研究協力者 関塚剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）
竹内史比古（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・室長）
山下明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

未知病原体や変異病原体による感染症疑いの不明症例の解明や、新興感染症の汎発流行に對し
的確な対処法を立案・整備する上で、次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA
sequencer: NGS）による網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの一つと考
えている。本計画は、臨床検体から網羅的に病原体を検出する次世代型病原体検査法へと発展さ
せ、原因不明症例を不明のまま残さない抜本的な検査法の改革に貢献するのが目的である。現在、
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで行政検査・依頼検査を遂行中であるが、こ
れら技術を普及させるべく、迅速な現場対応を可能とする地研・大学病院との感染症対策ネット
ワークの構築を目指す研究班である。

本年度は研究代表者として大学病院・地研でも次世代型検査法が運用可能になるよう、感染
研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サーバー
MePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) の運用も開始し、次世代
シーケンサーを有する研究分担者（地研・大学病院）が活用できるようシステム整備した。次
世代シーケンサーを導入した群馬衛研、山口衛研、富山衛研、東邦大をはじめ、計9機関の検
査担当者に技術研修を行い技術力向上に貢献した。各分担機関で懸案になっていた不明症例を中
心に、本技術研修を通して網羅配列解読した結果、簡易微生物検査キットでは陰性だったロタウ
イルス症例を特定することに成功し、既存キットの“特異性”だけでなく“感度”においても問
題点を指摘することができた。現在汎用されている検査キットのみでは不十分であり、これら成
果を検査現場に還元することで従来の病原体検査体制（レファレンス活動）へも充分に貢献する
ことが可能だと確信した。

不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・
技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。逐次、ネットワークの効率が悪い律
速段階をチェックし、臨機応変かつ重点的にエフォートを投じ、従来のレファレンス活動をより
重厚なシステムへと補強していきたい。今後さらに重厚な感染研と連携ネットワークを構築し、
迅速に病原体検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

研究分担者：

木村博一 国立感染症研究所・感染症疫学センター
小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所
調 恒明 山口県環境保健センター
佐多徹太郎 富山県衛生研究所
齋藤幸一 岩手県環境保健研究センター
館田一博 東邦大学・医学部・微生物・感染症学
片野晴隆 国立感染症研究所・感染病理部
梁明秀 横浜市立大学・医学部・微生物学

A．研究目的

感染症疑いのある不明症例・バイオテロ・新興再
興感染症などアウトブレイク対策のための迅速・網
羅病原体解析法を基盤とした感染症対策ネットワ
ークシステムの構築を行う。次世代シーケンサー（流
れ図参照）は大量の核酸配列を偏見無く網羅的に解

読することができ、本計画には必要不可欠である。
解読の結果、従来法で特定できない易変異性 RNA
ウイルスも“塩基配列”として確定することができ
る。地方衛生研究所（地研）における感染症発生动
向調査においても、重症あるいは原因不明感染症由
来の病原体網羅解析のニーズは極めて高く、1次ス

クリーニングとして**臨床検体からダイレクトに解読検査し、患者に生じている実像を把握**することは早期解決への極めて有効な手段と考えられる。

感染研では、次世代シーケンサーの解析パイプラインを整備し、不明症例について病原体候補の特定に役立ててきた（養殖ヒラメ・O111・新規サポウイルスによる集団食中毒、ワクチン接種後の脳炎）。しかしながら、網羅配列解読法は認知されつつあるが先端的すぎるために、結果の解釈と情報処理に困難を伴う場合も少なくない。また、地研との物理的な距離、諸手続き等による遅延が生じ、有効な解析法であっても迅速性を発揮できない。

病原体の網羅的 PCR 検査法は開発されているが、未知・易変異性ウイルス等では同定不能になる事例が少ない無い。それを補うための**次世代シーケンサーによる“迅速性”と“包括性”を地研および基幹病院などの検査・医療現場に提供**することを重視し、3カ年計画で地方衛生研究所と基幹病院と感染研との相互連携ネットワークの整備を重点的に行う。不明症例を迅速に究明するセーフティーネットとして、わが国における包括的な感染症対策に貢献することを目指す。

B. 研究方法

1. 感染症発生動向調査および食中毒事例において、迅速かつ網羅解析が必要な検体の収集および地研間の網羅解析ネットワークの構築
 - ・ 通常業務内で依頼された集団および重症例の臨床検体（髄液、血清、咽頭拭い液、便、尿）を次世代シーケンサーにより網羅配列解読を行う（研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田）。感染研では、各地研からの要望に応じて不明・重症例について適宜、網羅配列解読（研究代表者：黒田）および病理検体から新規、既知病原体の検索を行う（研究分担者：片野）
 - ・ 得られた配列をネットワーク経由で感染研（代表者：黒田）に転送し、担当者相互で病原体検索にあたる。従来の鑑別診断結果と網羅配列解読法の結果が符合するのかが照合し、一般検査法と網羅配列解読法の特異性・感度について検討する（研究代表者：黒田、研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田）
2. 不明感染症疑いの中でも厚労行政上で最重要項目である重症例を最優先し、想定以上の増悪に関わる混合感染など病原因子の特定も検討する。（研究代表者：黒田、研究分担者：小澤・齋藤・調・佐多・舘田・片野）

（倫理面への配慮）

試料提供者の個人情報、検体を提出する医療機関において削除され、試料には患者 ID がつけられる。本研究班で対象となる患者から検体を採取する場合は、各医療機関の倫理委員会にて本研究の承認を受けたのちに、インフォームドコンセントが得られた患者のみの検体解析を行う。緊急の対応が必要であったり、各医療機関の倫理委員会で検討できない場合は、感染研の倫理委員会で包括的に審査されるものとする。

連結可能匿名化ができる連続した番号を本研究の提供者個々の ID とし、研究者間の臨床データなどのやりとりはすべてこの ID を運用して行う。申請者には ID が付けられた検体と添付の情報が送付される。個人を特定するための対応表は医療機関が保管する（連結可能匿名化）。したがって、申請者において個人を特定することはできないようにする。本計画は国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認を受けた（H25/7/30 No.417, H26/2/18 No.495）。

C. 研究結果

1) ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまうケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速な病原体鑑別に資するものと考えている（図 1）。

本システムで特に重要なのが配列解読後の情報解析にあたる。基本、情報解析に特化した専門家が必要となるが、各自自治体に人材を用意もしくは養成している余裕はない。そこで、その煩雑な解析部分でできるだけ簡便化するために、検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用できるよう、Web interface による情報解析パイプラインを用意した。

2) 配列解読から情報解析まで

ベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)の解読リードを病院・地方衛生研究所等でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン(Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC) を構築した(図 2)。情報解析を習熟してい

ない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるような利便性を考えて作成した。本システム MePIC は、感染研、地方衛生研究所においても利用できる次世代型網羅的病原体検索システムをサポートする Web 情報解析サービスであり、現在、アカデミアのみアカウント取得可能として提供している。
<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

3) Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC

MiSeq 等の次世代シーケンサーの解読リードを下記の手順で必要な情報パラメーターを設定し、解析ボタンのワンクリックで解析をシームレスに行うことができる(図3)。

Target read files:

次世代シーケンサーの解読リードをアップロード

Reads trimming:

解読リードの不必要なアダプター配列の削除とクオリティーの低い塩基の削除

Screening:

bwa mapping 法によるヒト配列の削除(マウス等、他のほ乳動物のゲノム配列など、別途、レファレンス配列の指定が可能)

Reads classification:

megaBLAST によるデータベース検索。各種データベースの選択が可能。非特異的なヒットを選択しないよう、E-value 等の閾値の変更も可能

MePIC で解析した Megablast 解析結果は、配列アライメントを含むテキスト配列で排出される。そのテキスト配列をフリーソフト MEGAN (MEtaGenome Analyzer <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>) で生物種毎の系統分類をおこない、病原体候補を探索していく。臨床検体に内在する数多くの候補生物が抽出されるため、ここでの探索には病原体と感染症の知識が多分に要求される。

4) 網羅的病原体検査法の技術研修

臨床検体の DNA/RNA 調整、ライブラリー作製、MiSeq 次世代シーケンサー解読、情報解析までの技術研修を執り行った(4日間)。下記研修受講者を4回に分けて実施した。

・技術研修を修了した地衛研9拠点:

青森県環境保健センター
群馬県衛生環境研究所
富山県衛生研究所

東邦大学・医学部
岩手県環境保健研究センター
栃木県保健環境センター
山口県環境保健センター
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所

得られた成果については各分担者の研究報告書を参照。

D/E . 考察・結論

現在、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで感染症疑いの不明症例に対して行政検査・依頼検査を遂行中であるが、網羅的病原体検索法を普及させるべく、迅速な現場対応を可能とする地研・大学病院との感染症対策ネットワークの構築を目指している。本年度は感染研・病原体ゲノム解析研究センター・web サイトにてネットワーク化に不可欠な解析サーバー MePIC (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen) の運用を開始し、次世代シーケンサーを有する研究分担者(地研・大学病院)が活用できるようシステム整備できた。実際に本検査法が現場で活用できるよう、計9機関の検査担当者に技術研修を行い、各検査機関で懸案になっていた不明症例への解明に有効かどうか検討することができた。特に、簡易微生物検査キットでは陰性だった口タウウイルス症例を特定することに成功し、既存キットの“特異性”と“感度”の問題点を発見し、従来の病原体検査体制(レファレンス活動)へ還元できるシステムだと確信した。

不明症例の解明はもとより、検査現場・感染研のネットワーク構築のため、臨床・網羅的検査・技術研修・インフラ整備の全体の底上げを図る予定である。今後さらに重厚な感染研と連携ネットワークを構築し、迅速に病原体検出と行政対応が迅速に執り行えるよう、現場中心の検査体制の確立に貢献する。

F . 健康危険情報 とくになし

G . 研究発表

1 . 論文発表

MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67 (1): 62-65.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

網羅シーケンスの環境は整った。

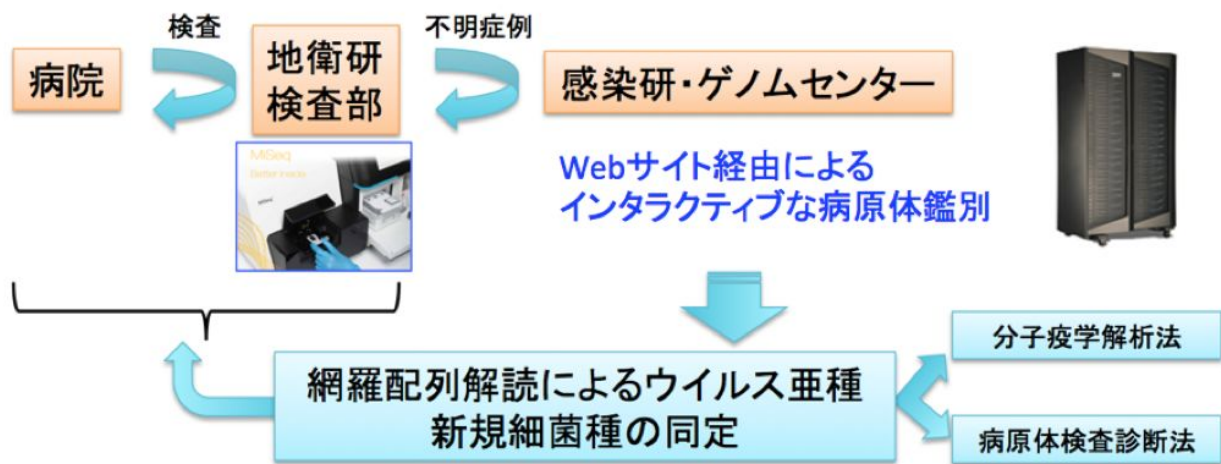


図1 ネットワーク経由による次世代型網羅的病原体検索のための解析システム。現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。地方衛生研究所等においても少しずつ整備されるようになってきた。検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用するために、Web interface による情報解析プログラムの開発と提供を試みた。

次世代型病原体検索システムをサポートする

Web情報解析サービスの提供

MePIC, Metagenomic pathogen identification for clinical specimens

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>



Welcome to MePIC v2.0

Please login to start

User ID: Password:

First visit? Please [register account](#).

[to MePIC manual](#)

- ヒト臨床検体からの網羅配列解読 (メタゲノム解読) の情報解析
- 臨床検体に内在する微生物群の分類
- 初心者でも使いやすい (生物学、感染症学の知識は欲しい)

現在、アカデミアのみアカウント取得可能

MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, Ogasawara Y, Mizuta K, Kuroda M. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):62-5. PMID: 24451106

図2 臨床検体からダイレクトに網羅配列解読したリード配列の情報解析パイプライン (Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC)。次世代シーケンサー NGS による解読リードの Web 情報解析サービス。

図3 MePICの操作画面の仕様。NGSリードから i)質の悪いリード、塩基の除去、ii)臨床検体に内在するヒト配列の削除、iii) megablast 検索による病原体検索。この i - iii までの一連の流れを一度に完結させるパイプライン。

➤ **次世代シーケンサーの配備状況:**

研究分担者機関に次世代シーケンサーMiSeq が配備された。

- 群馬県衛生環境研究所
- 富山県衛生研究所
- 山口県環境保健センター
- 東邦大学・医学部

➤ **次世代シーケンサー技術研修**

ライブラリー作製から解読、情報解析まで。3-4日間。計4回実施

・技術研修を修了した地衛研9拠点:

- ◇ 青森県環境保健センター
- ◇ 群馬県衛生環境研究所
- ◇ 富山県衛生研究所
- ◇ 東邦大学・医学部
- ◇ 岩手県環境保健研究センター
- ◇ 栃木県保健環境センター
- ◇ 山口県環境保健センター
- ◇ 愛媛県立衛生環境研究所
- ◇ 沖縄県衛生環境研究所

➤ **次世代シーケンサーの情報解析の運用状況:**

網羅的病原体検査法の情報解析パイプライン MePIC v2 を公開・運用中。