

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 氏名 館田 一博（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
研究協力者 氏名 青木弘太郎（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
嵯峨 知生（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座  
石井 良和（所属）東邦大学医学部微生物・感染症学講座

研究要旨

感染症診療において起因病原体の特定は、適切な治療を行う上で極めて重要である。しかし、培養や特定病原体の遺伝子を検出するこれまでの微生物検査法では起因微生物の特定が困難なことが少なくない。東邦大学医療センター大森病院で、臨床像から感染性心内膜炎が強く示唆されるにもかかわらず、血液培養で細菌が培養されず、その特定に至らなかった症例を経験した。当該患者は、弁置換術が施行されたことから、採取された疣贅および弁組織検体を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析および16S rRNAをコードする遺伝子解析による病原体の検出・同定を試みた。網羅的病原体ゲノム検索の結果、リード数から優勢と思われる主要な菌種は *Streptococcus pneumoniae* と *Abiotrophia defectiva* であった。並行して実施した16S rRNA解析でも全ての検体から *A. defectiva* の16S rRNAと相同性の高いDNA塩基配列が確認された。これまでの検査で原因菌が不明とされていた感染性心内膜炎症例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNAの塩基配列を解析することにより、原因菌が *A. defectiva* であることを特定するに至った。今回の結果から、通常検査では起因微生物が特定できない場合でも、網羅的病原体ゲノム解析により病原体を特定できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

感染症診療において適切な検査による原因微生物の特定は、治療薬を選択する上でも必要不可欠である。重症度が高いあるいは治療薬に反応しない、または長期間の治療を要する感染症において、原因微生物の同定は特に重要である。しかし感染症診療において、従来の検査法では感染症の原因微生物を特定することができない症例に遭遇することがある。このような場合、病原体に由来する遺伝子を検出することで起因微生物を推定することが可能な場合がある。

従来法で診断できない起因微生物を推定することは、感染症患者にもたらす治療上の有益性はきわめて大きいと考えられる。

2014年2月に、東邦大学医療センター大森病院で臨床像から感染性心内膜炎（IE）が強く疑われるにもかかわらず、起因病原体の特定に至らない患者に対して弁置換術が施行された。その際切除された組織（疣贅、および無冠尖、右冠尖、左冠尖）を対象に、感染症の起因病原体を特定することを目的に次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム検索を行なった。

## B. 研究方法

臨床像から感染性心内膜炎が疑われるが起病病原体の特定に至らなかった患者の弁置換術で切除された組織（疣贅：S25、および無冠尖：S26、右冠尖：S27、左冠尖：S28）より、核酸を抽出し、Nextera XT DNA Sample Prep kit (illumina) を用いて DNA ライブラリを作成した。DNA ライブラリのシーケンスは次世代シーケンサー（MiSeq, illumina）で行った。解析では、得られたデータのなかでクオリティの低いリードや塩基を除去し、さらにヒトゲノムに由来する配列を削除した。次に、残った配列を megablast で公知の病原体配列データベースと照合した。megablast で得られた結果を MEGAN（チュービンゲン大学）で閲覧した。検出された病原体分類上の属や種、そしてその配列数から IE の原因微生物を推測した。

16S rRNA をコードする遺伝子領域を PCR 法で増幅し、直接得られた増幅産物の塩基配列を決定することからも、併せて検体組織中に存在する病原体の特定を試みた。

### 倫理面への配慮

「微生物の網羅的検出法を用いた原因病原体の検索」は、東邦大学医学部倫理委員会から平成 25 年 12 月 19 日付で承認を受けている（課題番号：2510924060）。

本検査でも申請書に記載した通り、次世代シーケンサーで得られた配列からヒトゲノム情報を解析開始前の時点で削除した。具体的には、ヒトゲノム配列 (hs\_ref\_GRCh37) を対象にして Bwa mapping によりヒト配列に該当する解読リードを削除した。残る解読リードを病原体候補として megablast - nt および blastx- nr 相同性検索を行い、臨床所見に該当する病原体候補を抽出した。以上の結果、解析対象とした限定された配列情報のみから個人を特定することや、生活習慣病などの個人特有のリスク因子を特定することはできない。

## C. 研究結果

各リードの megablast でトップヒットした細菌グループを集計した。検体 S25 では、ヒト配列を除去後のリード数(136,683 本)のうち、Bacteria にヒットしたリードの割合が 4.87% (6652) であった。データベースに存在する配列にヒットしない配列は 84.8%(115,952 本)であった。Bacteria のリードのうち、Firmicutes にヒットした配列の割合が 94.0%(6250 本)であり(図 1)、そのうちリード数の割合として優勢な菌種は *Streptococcus pneumoniae* 16.2%(1001 本)、*Abiotrophia defectiva* 11.5%(710 本)の 2 つであった(図 2)。他の 3 検体でも同様の結果であった。

また、並行して実施した 16S rRNA をコードする DNA 塩基配列の解析からも全ての検体から *A. defectiva* の 16S rRNA と最も相同性の高い塩基配列が見出された。

図1. Bacteriaにおけるリードの内訳

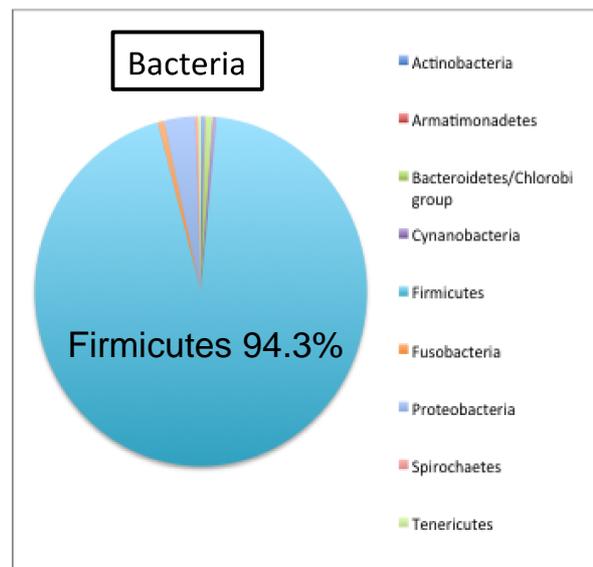
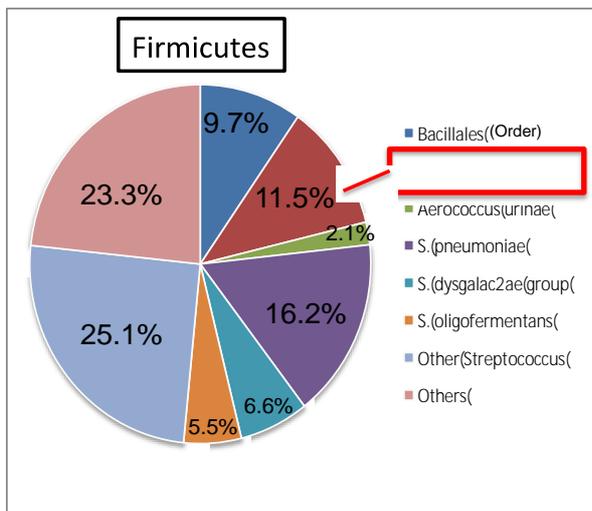


図2. Firmicutesにおけるリードの内訳



#### D. 考察

一般に、IEの起因病原体は血液培養から、もしくは疣贅等の感染部位の培養から検出される。しかし、本症例では血液培養から細菌が培養されなかった。さらに、培養法では弁置換術の際に切除された組織（S25～28）からも細菌は培養されなかった。

本研究では、次世代シーケンサーにより得られたデータを解析することにより、細菌のなかでも *S. pneumoniae* および *A. defectiva* のリードが優勢であった。IEの原因菌として *S. pneumoniae* は考えにくく、過去に *A. defectiva* によるIEや血流感染の報告が見られたため、本菌種が原因菌として有力であると考えられた。

また、16S rRNAをコードするDNA塩基配列を解析したところ、いずれの検体から *A. defectiva* の16S rRNAと最も相同性の高い配列が確認された。この2つの解析結果を総合して、今回のIE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えた。

次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析は、起因微生物が予測できない場合や、本症例のように培養陰性である場合にその力を発揮する。また、本手法は定量性もあるため、患者もしくは対象検査材料内における微生物量を判断できる。

本研究では、原因微生物が培養不可であった感染症の、次世代シーケンサーを用いた病原体ゲノムの網羅的解析が、病原微生物

物の同定と臨床診断の一助となることを示した。

#### E. 結論

原因菌が不明であったIE症例の疣贅および弁検体を用いて次世代シーケンサーを用いた網羅的病原体ゲノム解析と16S rRNA解析を実施した。その結果、本IE症例の原因菌は *A. defectiva* であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

