

令和6年度
厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」
分担研究報告書
次世代シーケンス技術による血液中の病原体検出法の開発

研究分担者 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 堀場千尋
研究協力者 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 橋野正紀

研究要旨

本研究は、次世代シーケンス（NGS）を用いた献血血液中の病原体検出法の確立を目的とし、非感染血液からの標準データ取得と解析パイプラインの開発、感染血液を用いた検証と改良を行う。実験室内操作であるWETとデータ解析であるDRY両面からの最適化を図り、信頼性の高い血液用メタゲノム解析法の確立を目指す。NGSの血液中の病原体検出法の確立のため、標準作業手順書、解析プログラムを整備し、NGS解析の運用基盤の構築を進めた。

A. 研究目的

次世代シーケンス（NGS）による臨床メタゲノム解析とは、患者から採取した検体中に含まれる微生物由来のDNAとRNAを包括的に分析する手法であり、感染症の診断や評価に利用されている。これは、献血血液の安全性を確保するための網羅的な病原体検出方法への応用も期待されている。一方で、血液検体における臨床メタゲノム解析は研究途上にあり、標準的な解析プロトコルはWETとDRYのいずれも定められていない。特にコンタミネーションの制御と管理については病原体検出の信頼性に大きく関わるため重要な課題である。本研究では、NGSを献血血液の安全性確保に利用することを目標に、信頼性の高い血液検体からの病原体検出法をWET、DRYの両面から開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 血液メタゲノムレファレンスの構築

輸血用血液製剤には「赤血球製剤」「血漿製剤」「血小板製剤」「全血製剤」など様々な種類があり、各検体種に応じたコンタミネーションの制御・管理方法の策定が望ましい。本研究では、血液検体から検出される微生物由来配列を集積し陰性コントロールとしての血液メタゲノムレファレンスの構築の基礎データとする。

対象として、国立国際医療センター国際感染症センターで保管されていた血液培養陽性であった感染症患者 30 例の血液検体を用いた。全ての血液検体は国立国際医療センター内の臨床検査室で処理され、①全血（処理なし）、②血清（凝固後の上清）、③血漿（抗凝固剤処理後の上清）、④乾燥濾紙血液として国立感染症研究所で NGS 解析を進めた。検体処理用の濾紙として、従来の微生物検査法において病原体検出に利用されている QIAcard FTA Classic を

選択した。すべての検体中のウイルスを含む病原体由来の核酸の存在は NGS 解析の他に multiplex PCR（FilmArray 血液培養パネル）も用いて確認した。培養された細菌のゲノム情報を除くメタゲノムデータを用いて血液メタゲノムレファレンスの構築を目指した。

2. メタゲノム解析パイプラインの開発

検体の背景となるコンタミネーションの管理、宿主側はデータ解析上の偽陽性の制御を目的として、現在、原因不明感染症のために開発中であるメタゲノム解析パイプライン PATHDET に組み込み、血液検体に最適化した臨床メタゲノム解析パイプラインの開発を行った。

（倫理面への配慮）

「臨床メタゲノム解析に最適化した血液検体処理法の研究」（No 1850, 令和 6 年 10 月 10 日承認）として、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得た。

C. 研究結果

1. 血液メタゲノムレファレンスの構築

対象とした感染症患者 30 例の血液培養結果の内訳は、*Staphylococcus aureus* 4 例、*Staphylococcus caprae* 1 例、*Streptococcus dysgalactiae* 2 例、*Staphylococcus haemolyticus* 1 例、*Actinomyces naeslundii* 1 例、*Bacillus subtilis* 1 例、*Bacteroides uniformis* 1 例、*Candida albicans* 1 例、*Citrobacter koseri* 1 例、*Clostridium perfringens* 1 例、*Edwardsiella tarda* 1 例、*Escherichia coli* 8 例、*Klebsiella pneumoniae* 2 例、*Micrococcus luteus* 1 例、*Morganella morganii* 1 例、

Peptoniphilus species 1 例、*Phocaeicola(Bacteroides) vulgatus* 1 例、*Rothia(Kocuria) kristinae* 1 例であった。すべての血液検体は multiplex PCR も行い、病原体陰性であることが確認された。方法に記載に従い処理された血液検体は、NextSeq2000(Illumina)を用いて 150bp x2 の設定で NGS を行った。総出力として 105,615,240 reads が取得された。このうち、ヒトゲノム由来の配列を除去し、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide collection (nt) database に BLAST hit した配列は、59,080 reads であり、処理法にかかわらず血液培養で検出された細菌の読み取りの有意な検出は認められなかった。現在、BLAST hit しなかった配列情報の追加解析中である。すべてのシーケンスデータを確認した後、培養された細菌のゲノム情報を除くメタゲノムデータを血液メタゲノムレファレンスとして構築する予定である。

2. メタゲノム解析パイプラインの開発
不明症例の臨床検体を使用したメタゲノム解析結果から病原体候補を提案するパイプライン PATHDET を開発した。入力データとして Short-read sequencing の結果と Long-read sequencing の結果の両方を受付可能のプログラムとした。これまでの血液検体のメタゲノムデータを基に、実験中に設定したネガティブコントロールから自動的に内部コントロールとなる微生物を設定し、検査対象のメタゲノム解析結果をもとに標準化、コンタミネーションと推定される配列を減算するプログラミングを開発した。試験的に導入し、病原体検出における実用性を現在検証中である。

D. 考察

NGS を用いた血液からの細菌検出法では血液培養法で培養される細菌を検出できない場合があることが示唆された。Multiplex PCR でも検出されなかったため、NGS の感度による検出限界未満の細菌量であったことも考えられたが、データ解析上の検出不良であるかを今後検証する必要がある。また、原因とする細菌以外の微生物ゲノム検出が、原因菌をマスクする可能性があり、その対策として実験室内で設定したネガティブコントロールからのコンタミネーション減算法が開発された。今後、このプログラムが病原体検出に有用であるか検証が必要であると考えらる。

E. 結論

NGS は網羅的な病原体検出方法への応用も期待されている。引き続き技術面、プロトコル面、解析面での検証を行い、献血血液の安全性を確保するための網羅的な病原体検出方法へ応用できる検査系としての開発研究を行う必要がある。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表 論文発表 該当なし

学会発表

1. 堀場千尋. NGS解析とデータ管理方法、原因不明症例解析の実例を交えて. 令和6年度第1回 神戸市健康科学研究所 健科研セミナー. 6月5日, 2024年, 神戸.
2. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノムアプローチ. 第30回分子寄生虫ワークショップ 第20回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会. 8月28日, 2024年, 千葉.
3. 堀場千尋. Clinical Metagenomic Sequencingの感染症診断への活用. 第25回東海病原微生物研究会. 10月12日, 2024年, 名古屋.
4. 堀場千尋. 次世代シーケンスによる感染症診断を通じて見る「臨床とWETとDRYの連携」. 第28回日本ワクチン学会・第65回日本臨床ウイルス学会合同学術集会. 10月26-27日, 2024年, 名古屋.
5. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノム解析を用いた感染症診断. 第1回金沢臨床感染症セミナー. 12月11日, 2024年, 金沢.
6. 堀場千尋. 感染症分野におけるNGSの基礎的知識. 第36回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 1月25日, 2024年, 名古屋.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし