

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書（令和6・7年度）

原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築

研究分担者 長島 真美 東京都健康安全研究センター
研究協力者 浅倉 弘幸 東京都健康安全研究センター
研究代表者 貞升 健志 東京都健康安全研究センター

研究要旨

原因不明疾患等における次世代シーケンサー（NGS）の利用は、近年、重要視されており、年々増加傾向にある。しかしながら、解析法についてはこれといった標準法はなく、地方衛生研究所（地衛研）独自での解析方法の確立が急務である。今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価を行った。結果として、どちらの解析ソフトも機能的に市販ソフトと同等以上であることが示され、十分に地衛研の NGS 解析に役立つことが示された。また、臨床検体からの直接の NGS 解析は、個人のゲノムデータも一緒にデータ化してしまう懸念があり、倫理的な問題点の解決策を指摘される場合も想定される。そこで、全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患における NGS 利用について、9月2日～9月24日に計11問のアンケート調査を実施した（回答率90.7%）。その結果、次世代シーケンサー（NGS）は、85.9%の地衛研が所有し、不明疾患での NGS 使用は「研究として必要」が62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が46.3%、「検査法として必要」は29.9%であった。倫理的な問題については、「各所で倫理委員会を通しておくべき」が52.2%と最も多かった。また、以上の結果を含めて、地衛研の職員を対象とした Web 研修会を実施した。

A. 研究目的

原因不明疾患における、次世代シーケンサー（NGS）の利用および解析は、従来より重要視されてきた。特に、茨城県衛生研究所が関与し、報告がなされたオズウイルス感染症の究明では、国立感染症研究所（感染研）の解析システムが使用された経緯がある。一方で、感染研の解析システムは、現在、地方衛生研究所（地衛研）の使用が不可能であり、地衛研独自での不明疾患検査体制の確立（解析方法の確立）が急務であった。

また、多数のプライマーを使用し、PCRを行った後に NGS 解析を行うアンプリコンベースの NGS 解析では、NGS 解析の感度・特異性向上で重要な要素であるが、最終

的に使用したプライマーの除去が必須である。この手法は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）解析で、全国で実施されてきた。この解析では、感染研の Web サイト：PathoGenS が利用されているが、SARS-CoV-2 以外の病原体解析には利用できない。

さらに、臨床検体からの直接の NGS 解析法は、個人のゲノムデータも一緒にデータ化してしまう懸念もあり、倫理的な問題点の解決策を指摘される場合も想定される。そこで、全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患の原因究明を目的とした次世代シーケンサー（NGS）の利用に関して、9月2日～9月24日に計11問のアンケート調査を実施した。

本分担研究では、原因不明疾患における網羅的解析やアンプリコン NGS 解析に適した解析ソフトの構築・導入、地衛研における原因不明疾患における NGS 解析についての意識調査および地衛研への研修を目的とした。

B. 研究方法

1. 不明疾患解析検体の解析

東京都健康安全研究センターウイルス研究科に搬入され、ノロウイルスが検出された糞便検体 2 検体から抽出した RNA を供試し、NGS データをウイルス解析用パイプライン (PaHuM) (関塚産業有限会社) で解析を行い、検出したウイルスゲノムのリード数で解析ソフトの有用性を検討した。さらに、インフルエンザウイルスウイルスが検出された臨床検体より rRNA の除去の有無による解析データを検討した。

2. アンプリコン NGS 解析

東京都健康安全研究センターウイルス研究科に搬入された SARS-CoV-2 検体で、PCR 増幅後の産物を解析ソフト MTAAP (関塚産業有限会社) と従来法でのプライマー部分の除去、コンセンサス配列の取得を比較検討した。

3. アンケート調査

地方衛生研究所全国協議会のメールを用い、原因不明疾患の原因究明を目的とした次世代シーケンサー (NGS) の利用に関して、2025 年 9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 問のアンケート調査を実施した。

4. Web 研修会

本研究班で検討した内容を地衛研セミナーとして、Web 研修を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究班で実施する事項については、東京都健康安全研究センター倫理委員会で承認されている (6 健研健第 906 号)。

C. 研究結果

1 不明疾患解析ソフトの使用

ウイルス解析用パイプライン (PaHuM) は (図 1)、臨床検体を用いた NGS 解析データ (メタゲノム) 中に含まれる宿主 (ヒ

ト) ゲノムの除去、およびウイルスデータベースを用いたウイルスリードの検索を行うソフトである。ノロウイルスが Ct 値 30 前後で検出された糞便検体 2 検体の解析で、それぞれ Contig の長さは異なるが、2 検体からノロウイルス GI が検出された (図 2)。

また、rRNA の除去効果を見る目的で、検討したところ、rRNA 除去した方が、各セグメントのリード長、カバレッジともに高い結果が得られた (図 3)。

2 アンプリコン NGS 解析

解析ソフト MTAAP は、アンプリコン内のプライマー配列を除去するのみではなく、コンセンサス配列の取得や、変異解析まで可能である (図 4)。

今回、SARS-CoV-2 の解析を本ソフトで実施したところ、従来、Ubuntu (プライマー除去) + CLC Genomics Workbench (変異解析) の解析では 40 分程度かかっていたものが、MTAAP では 5 分程度であった (図 5)。また、MTAAP と CLC Genomics Workbench の解析結果はほぼ一致した。一部では、CLC で変異なしとされた部分が、MTAAP では Mix 塩基と判定されるなど、有用性が示された (図 6)。

3. アンケート調査

アンケート回答率は、90.7%であった。下記にそれぞれの問に関する結果を示す。

1) 次世代シーケンサーの保有率

67 地衛研 (85.9%) が次世代シーケンサーを保有と回答した (図 7)。

2) NGS 解析の対象 (病原体)

2025 年度に実施している NGS 解析の対象病原体に関する問いでは、次世代シーケンサーを有する地衛研の 97% は新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の解析を行っていた (図 8)。

また、SARS-CoV-2 以外では、インフルエンザウイルス (10 施設)、ノロウイルス (8 施設)、CRE 等のプラスミド解析 (13 施設)、結核菌 (26 施設)、腸管出血性大腸菌 (9 施設)、原因不明疾患 (10 施設)、分離ウイルス (13 施設) であった (図 8)。

3) 原因不明疾患における NGS 利用

原因不明疾患等の臨床検体を用いた次世代シーケンサー (NGS) の検査利用に

ついて、現時点での必要性を聞いたところ、「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった（図 9）。

4) 原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用における倫理的な問題

原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用における倫理的な問題を問うたところ、「各所で倫理委員会を通しておくべき」は、52.2%と最も多く（図 10）、「ヒトゲノムを削除した上で解析すれば良い」は 17.9%、「倫理的な問題は生じない」は 10.4%、「本庁とも調整、倫理上の心配なし」は 6.0%であった。

5) 原因不明疾患（臨床検体）においての NGS 解析を実施の有無等

「過去に原因不明疾患（臨床検体）において、NGS 解析を実施したことがあるか？」の問いでは、14 か所（20.9%）があると回答した（図 11）。さらに、原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析において、使用した解析ソフトについて聞いたところ、国立感染症研究所（感染研）の Mepic/VirusTap が 9 か所であったのに対し、CLC Genomics Workbench と PaHum が 7 か所であり（図 12）、Mepic/VirusTap の代替も着実に進んでいることが明らかとなった。

原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析での倫理委員会での許可の有無について聞いたところ、11 か所は倫理委員会での許可を得ていた（図 13）。さらに、倫理委員会が必要とされた主な要件としては、「個人の同意」が 5 か所、「匿名化」は 6 か所であった（図 14）。

6) 原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析を実施する上で必要と考えられるもの

継続的に原因不明疾患（臨床検体）の NGS 解析を実施する上で、必要と考えられるものとしては、消耗品予算、NGS 本体の更新、NGS 本体の点検費、解析ソフト・サーバー、人的資源、研修すべてで、多くの地衛研が必要と答えた（図 15）。

7) 通知やマニュアルへの記載

原因不明疾患（臨床検体）における NGS の利用について、厚労省等からの通知や感染研の病原体検出マニュアルへの記載につ

いて聞いたところ、「厚生省の通知が是非必要」は 83.6%、「病原体検出マニュアルへの記載が必要」は 76.1%であった（図 16）。

最後に、原因不明疾患（臨床検体）における NGS 解析の利用についての統一的な検査マニュアルの必要性について聞いたところ、92.5%が「必要」と回答した（図 17）。

4.Web 研修会

2025～2026 年に原因不明疾患における NGS 利用等に関する Web 研修会を 3 回実施した。詳細は下記の通りである。

1) 地衛研 Web セミナー第 4 回「Mini」

テーマ：不明疾患における NGS 解析法について考えてみる

<https://www.youtube.com/watch?v=GSEGa7CWFU>

① 江原勇登（埼玉県衛生研究所）

「不明疾患における NGS 使用と解析について」

② 浅倉弘幸（東京都健康安全研究センター）

「糞便材料を使用した NGS 解析により判明したアストロウイルス」

③ 黒木絢士朗（東京都健康安全研究センター）

「海外のサイトを利用した NGS 解析（原因不明疾患）の比較と問題点」

④ 木村博一（群馬パース大学大学院保健科学研究科）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用バイオインフォマティクスパイプラインプログラムの使用経験」

⑤ 関塚剛史（関塚産業有限会社）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用バイオインフォマティクスパイプラインプログラム PaHuM のライセンス・仕様等について」

2) 地衛研 Web セミナー第 5 回「Mini」

テーマ：不明疾患における NGS 解析ソフト PaHuM と PCR 増幅後の NGS 解析用ソフト MTAAP のご紹介

<https://www.youtube.com/watch?v=gv8-hAcNpgk>

①関塚剛史（関塚産業有限会社）

「メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用パイプライン PaHuM の使用方法の説明について」

②江原勇登（埼玉県衛生研究所）

「マルチプレックススタイリング PCR 増幅断片解析用 バイオインフォマティクスパイプラインプログラム MTAAP の使用経験 (その1) ③浅倉弘幸 (東京都健康安全研究センター)

「MTAAP の使用経験 (その2)」

④関塚剛史 (関塚産業有限会社)

「MTAAP の仕様等について」

3) 地衛研 Web セミナー第 8 回「Mini」

「原因不明疾患における NGS のアプローチ」を行った。

<https://www.youtube.com/watch?v=RH8mWs1CEuc&feature=youtu.be>

①「NGS データを用いた解析をはじめの“とっかかり”」

福岡県保健環境研究所 重村 洋明

②「不明疾患における NGS 利用のアンケート調査結果について」

東京都健康安全研究センター 長島 真美

③「原因不明疾患における NGS 解析法について」

東京都健康安全研究センター 浅倉 弘幸

④「不明疾患における NGS 利用の特徴と注意点について」

埼玉県衛生研究所 江原 勇登

⑤「原因不明疾患に対応するゲノムサーベイランスに関する海外の動向と今後の課題」

JIHS 国立感染症研究所 堀場 千尋

D. 考察

今回、不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP の評価を行った。不明疾患解析での NGS 利用は、オズウイルス感染症の報告から、地衛研の業務としての期待が大きい。一方で、解析を担ってきた感染研の Web 解析ソフトが使用できない現状あった。また、海外でも同様の Web 解析サイトはあり、同様の結果は得られるものの、ヒトゲノムを含む可能性もあり、躊躇する地衛研も多い。今回、新たに導入可能なソフトの有用性を示すことができ、今後の地衛研における使用拡大が期待される。特に、MTAAP については、解析ソフトの開発をこちらから持ち込み、共同開発を行った。

結果として、どちらの解析ソフトも機能的に市販ソフト以上であることが示された。

一般に、NGS 解析ソフトの値段は著しく高価であり、ライセンス更新が必要になる。今回、検討した解析ソフトは比較的安価であり、十分に地衛研の NGS 解析に使用可能であることが示された。

原因不明疾患解析での NGS 利用は、オズウイルス感染症の発見報告から、地衛研の業務としての期待が日々大きくなっている。一方で、臨床検体には個人のゲノム情報を含むことから、倫理的な問題を解決すべき議題とし、研究を実施した。昨年度は、NGS 解析系の構築を行い、今回は、原因不明疾患における倫理に着目し、アンケート調査を実施した。

今回のアンケート調査の結果から、倫理に関する点については、各地衛研で様々な見解があることが判明したが、倫理審査に関しては、「各所で倫理委員会を通しておくべき」52.2%であった。しかしながら、原因不明疾患における NGS の利用は、積極的疫学調査等の緊急の場合が多く、必ずしも倫理審査が間に合わない場合も想定され、現在のところ、包括的な視点で考えていくしか道がないと思われる。

真にこれを解決するためには、疾患ごとの厚労省等からの通知や JIHS 感染研の病原体検出マニュアルへの記載が必要と思われる。

E. 結論

不明疾患解析検体およびアンプリコン NGS 解析を行う解析ソフト PaHuM ならびに MTAAP は、地衛研における NGS 解析用ソフトとして、安価かつ高機能であり、利用可能である。

全国の地方衛生研究所の担当者を対象に、原因不明疾患における NGS 利用について、9 月 2 日～9 月 24 日に計 11 回のアンケート調査を実施した。その結果、回答率は 90.7%であった。次世代シーケンサー (NGS) は、85.9%の地衛研が所有し、不明疾患での NGS 使用は「研究として必要」が 62.7%と最も多く、「通常検査のオプション」が 46.3%、「検査法として必要」は 29.9%であった。倫理的な問題については、「各所で倫理委員会を通しておくべき」が、52.2%と最も多かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashima A, Tsuchiya K, Kuroki K, Nagashima M, Koizumi Y, Nakamoto T, Mizushima D, Aoki T, Sadamasu K, Teruya K, Yoshimura K, Gatanaga H. : Prolonged severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection and intrahost viral evolution in a severely immunocompromised patient with human immunodeficiency virus infection: A whole-genome sequencing study., Int J Infect Dis. 2026 Apr;165:108453. doi: 10.1016/j.ijid.2026.108453.
- 2) Uriu K, Okumura K, Uwamino Y, Chen L, Tolentino JE, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Ito J, Sato K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 NB.1.8.1 variant., Lancet Infect Dis. 2025 Aug;25(8):e443. doi: 10.1016/S1473-3099(25)00356-1.
- 3) Kaku Y, Okumura K, Kawakubo S, Uriu K, Chen L, Kosugi Y, Uwamino Y, Begum MM, Leong S, Ikeda T, Sadamasu K, Asakura H, Nagashima M, Yoshimura K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ito J, Sato K.: Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XEC variant., Lancet Infect Dis. 2024 Dec;24(12):e736. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00731-X. Epub 2024 Nov 6.
- 4) Kumagai R, Kawakami M, Kasuya F, Yamada K, Takahashi A, Murayama K, Morita K, Kaneyasu T, Tamai N, Hasegawa M, Harada S, Amano A, Fujiwara T, Miyake H, Nagashima M, Sadamasu K.: Sewage surveillance of SARS-CoV-2 in Tokyo (May 2020-June 2022): method using high-throughput, fully-automated platform., Virusdisease.

2024 Sep;35(3):520-524. doi: 10.1007/s13337-024-00880-z. Epub 2024 Jul 2.

5) 黒木 絢士郎：ノロウイルス遺伝子型別における RNA-Seq NGS 解析サイトの活用、東京都微生物検査情報、45, 6-8, 2024

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

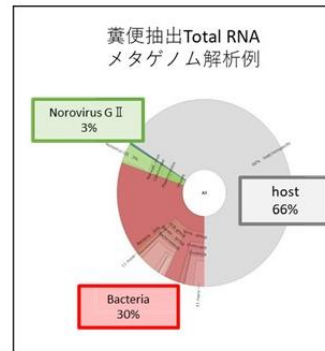
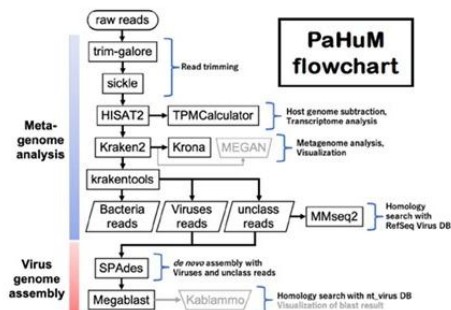
3. その他

なし



メタゲノム解析・ウイルスゲノム解析用パイプライン

- ・メタゲノム中に含まれる宿主（ヒト）ゲノム除去
- ・ウイルスデータベースを用いたウイルスリードの検索



Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (295); Primate norovirus (7)	Norwalk virus (400)	4

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
6727	11.0	MK596174.1	Norovirus GI isolate G29-G22 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

図1. ウイルス解析用パイプライン (PaHuM) について

ライブラリ調製試薬： SEQuoia Express Stranded RNA Library Prep Kit
rRNA除去（ヒト）： SEQuoia RiboDepletion Kit
次世代シーケンサー：iseq 150bp×2 PE
解析：PaHuM

Sample : 1
Virus : Norovirus
GI
RNA : 糞便乳剤
Ct : 30.0

Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (295); Primate norovirus (7)	Norwalk virus (400)	4

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
6727	11.0	MK596174.1	Norovirus GI isolate G29-G22 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds
550	3.8	MK596175.1	Norovirus GI isolate G19-003 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds
434	1.8	MK638208.1	Norovirus GI isolate BA81265 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; and VP1 (ORF2) and VP2 (ORF3) genes, complete cds
257	0.8	PQ894187.1	Norovirus GI isolate IC_285 nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

Sample : 2
Virus : Norovirus
GI
RNA : 糞便乳剤
Ct : 29.8

Kraken2 detected virus name	MMseqs2 detected virus name with Kraken2 unclass reads	Num. virus sequence
Norwalk virus (60); Primate norovirus (44); Shallot latent virus (1); Tobacco mild green mosaic virus (1)	Norwalk virus (110); Primate norovirus (51); Shallot latent virus (2)	10

Contig length	Coverage read depth	Subject sequence id	Hit seq title
826	7.0	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
1906	6.3	MN922742.1	Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW3108/2019/TWN nonstructural polyprotein, RdRp region, (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds
372	5.2	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
710	4.2	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
1498	3.9	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
842	3.3	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
915	3.0	PQ632217.1	Norovirus GI isolate NS19217 nonstructural polyprotein (ORF1), VP1 (ORF2), and VP2 (ORF3) genes, complete cds
291	0.8	MK596174.1	Norovirus GI isolate G29-G22 nonstructural polyprotein (ORF1) gene, partial cds; VP1 (ORF2) gene, complete cds; and VP2 (ORF3) gene, partial cds

図2. PaHuMを用いたノロウイルス解析例

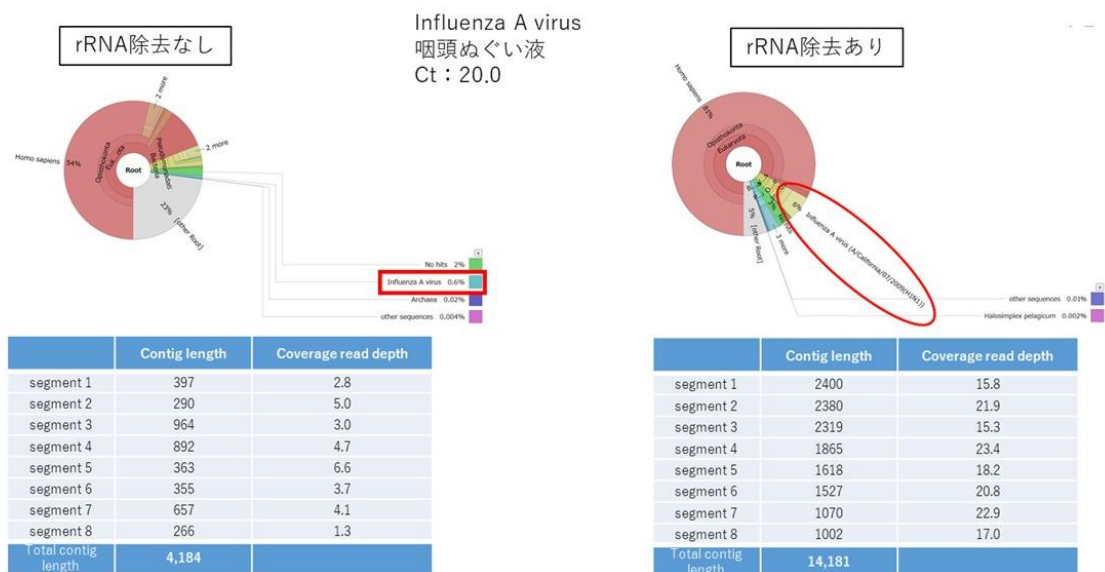
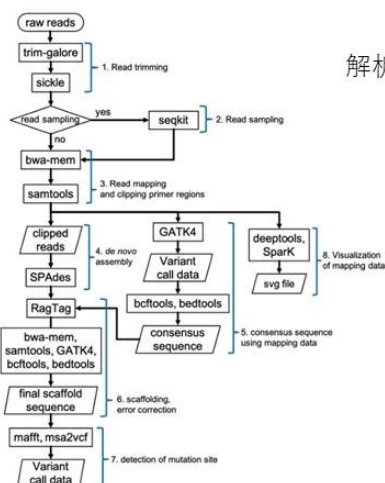


図3. rRNA除去の有無によるインフルエンザウイルス解析例



マルチプレックスPCR 増幅断片解析用パイプライン



解析対象ウイルスゲノムをマルチプレックスPCRで増幅

増幅産物のプライマー部分を除去し、
コンセンサス配列を取得

変異解析

ウイルス特異的な変異の検出

- 大きな欠損
- 混合感染
- ミックスアレル

図4. ウイルス解析用パイプライン (MTAAP) について

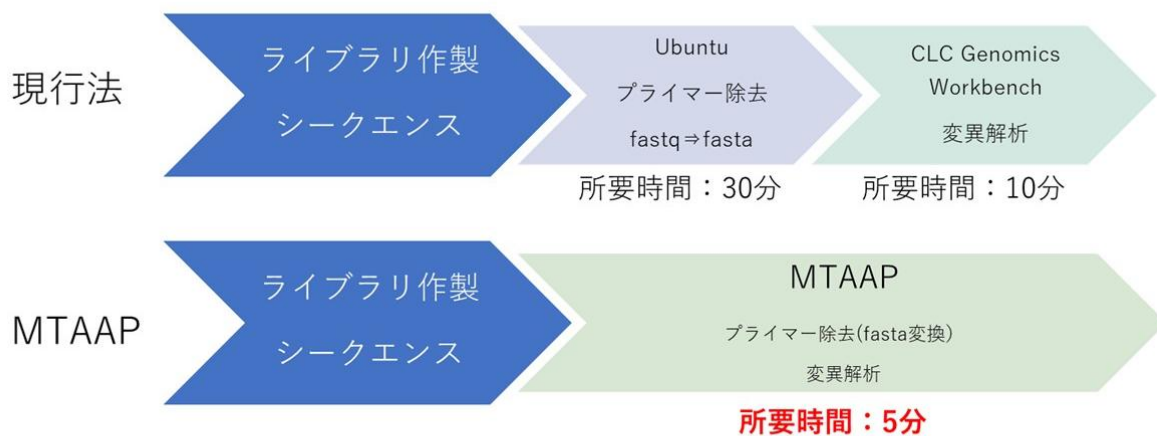


図5.MTAAPを使った新型コロナウイルス解析①



図6. MTAAPを使った新型コロナウイルス解析②

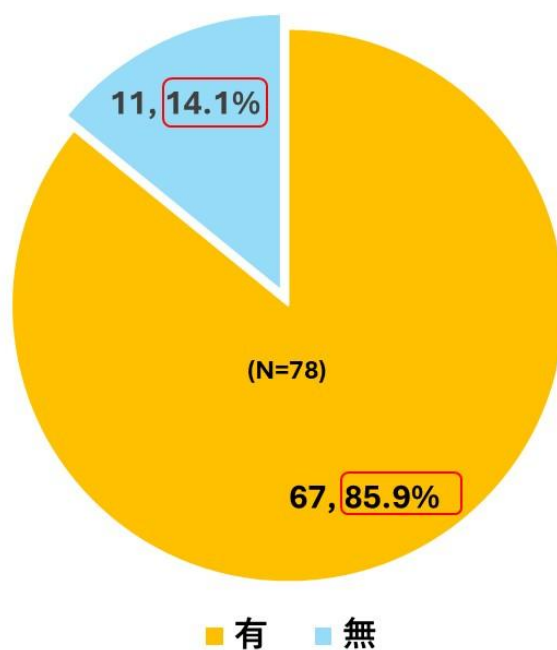


図7 次世代シーケンサーの保有状況

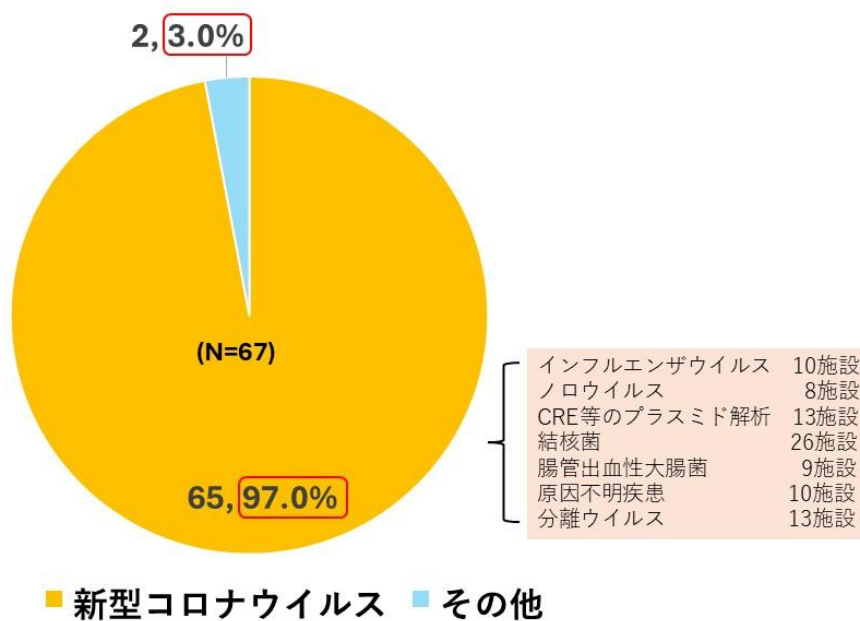


図8 2025年度に実施しているNGS解析の対象（病原体）
（予定も含む。複数回答可）。

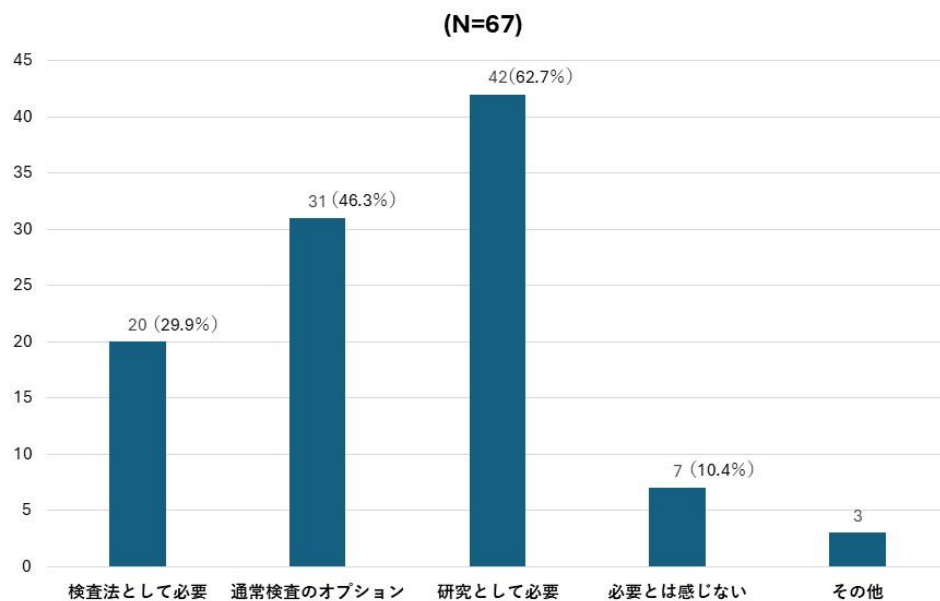


図9 原因不明疾患等の臨床検体を用いた次世代シーケンサー（NGS）の検査利用について、貴所としての現時点での必要性を教えてください。（複数回答可）

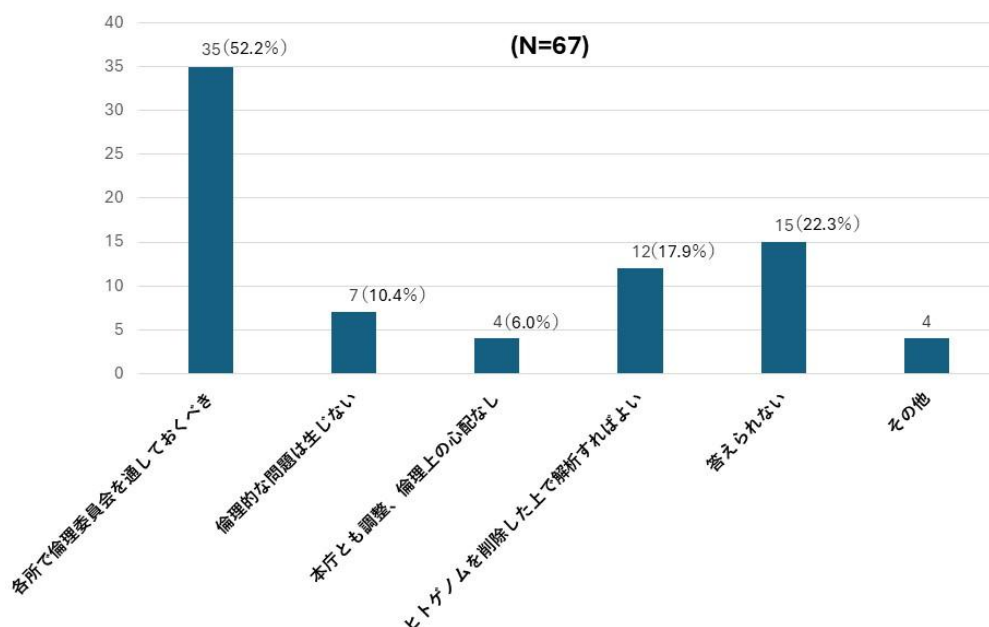


図10 原因不明疾患（臨床検体）におけるNGS解析の利用における倫理的な問題

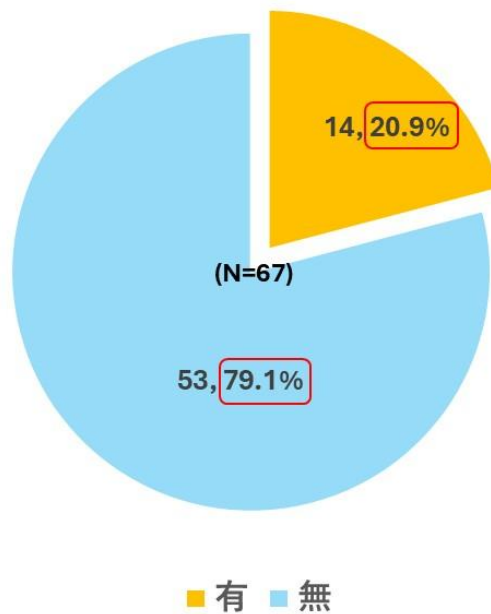


図11 過去に原因不明疾患（臨床検体）において、NGS解析を実施したことがあるか？

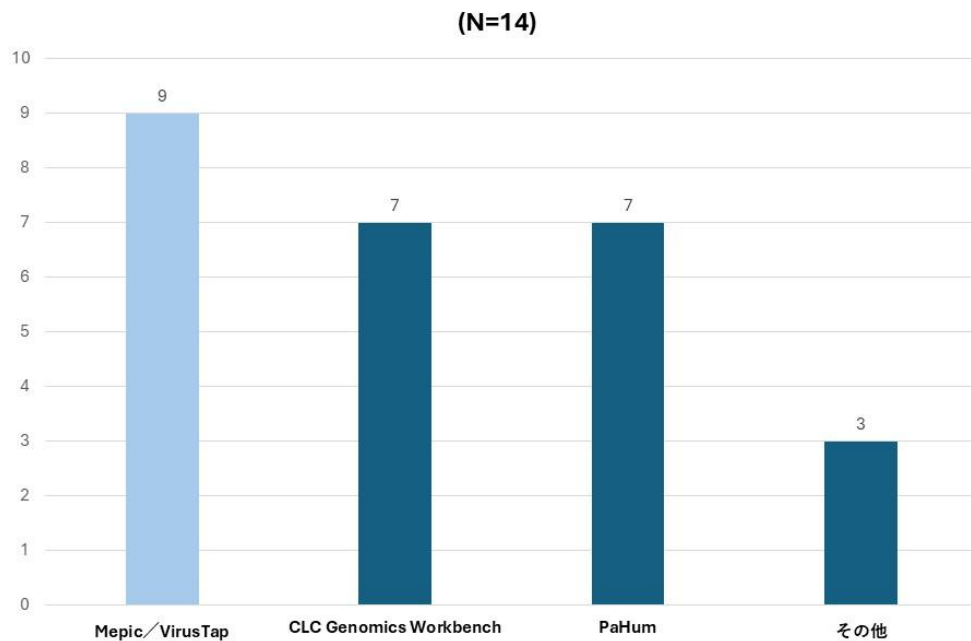


図12 原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析において、使用した解析ソフト（または解析プラットフォーム）（複数回答可）

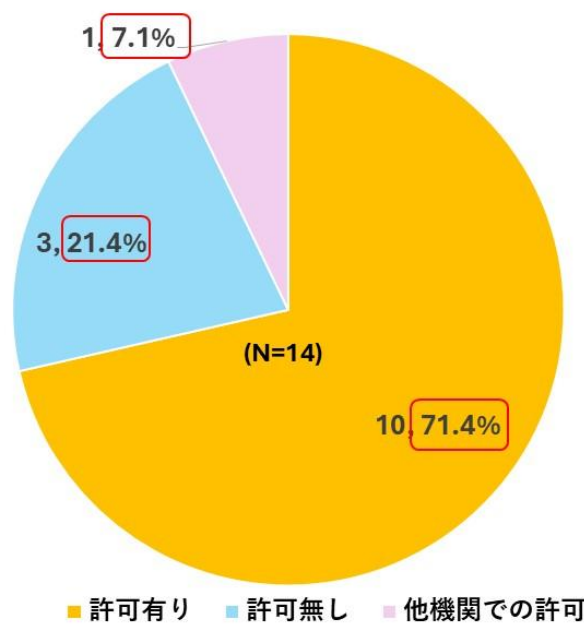


図13 貴所において、原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析で、倫理委員会での許可の有無について教えてください。

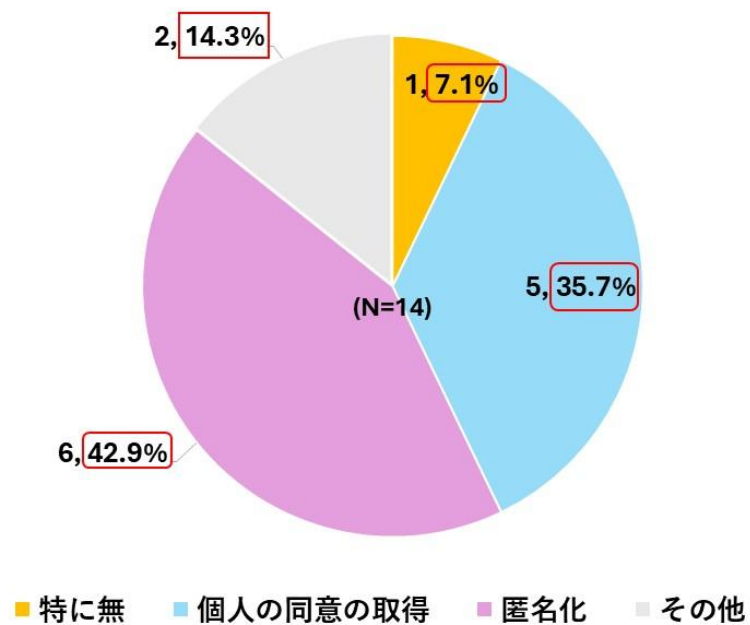


図14 倫理委員会で必要とされた主な要件（複数回答可）

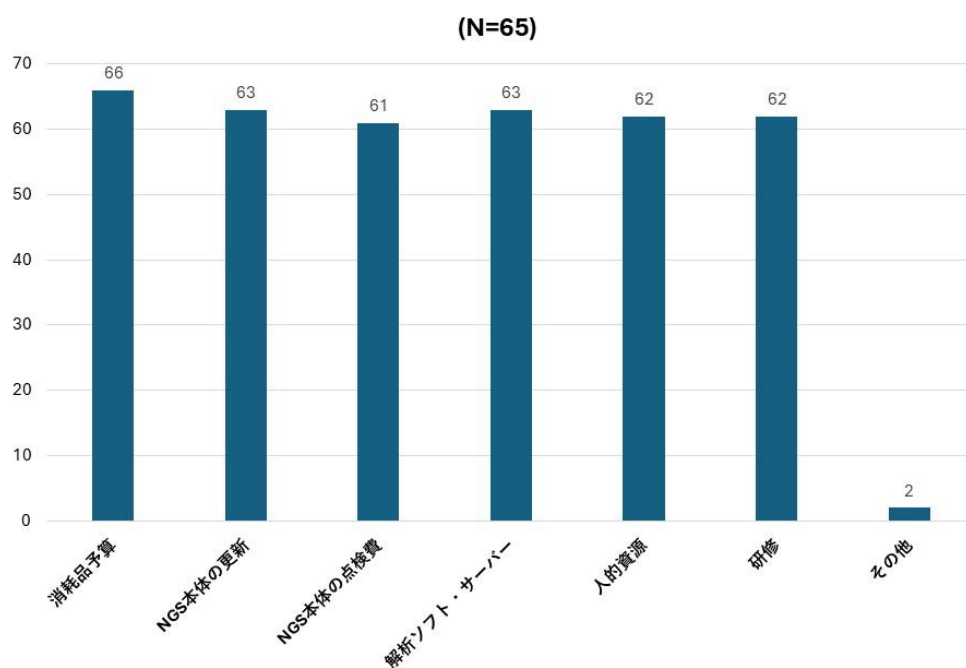


図15 継続的に原因不明疾患（臨床検体）のNGS解析を実施する上で、必要と考えられるもの（複数回答可）

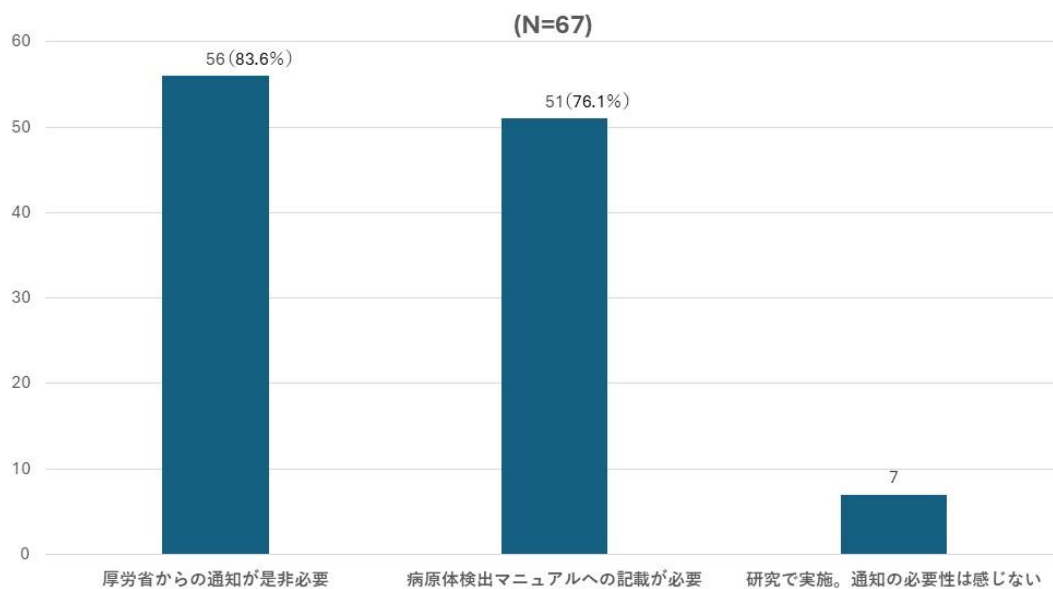


図16 原因不明疾患（臨床検体）におけるNGSの利用について、厚労省等からの通知や病原体検出マニュアルへの記載（複数回答可）

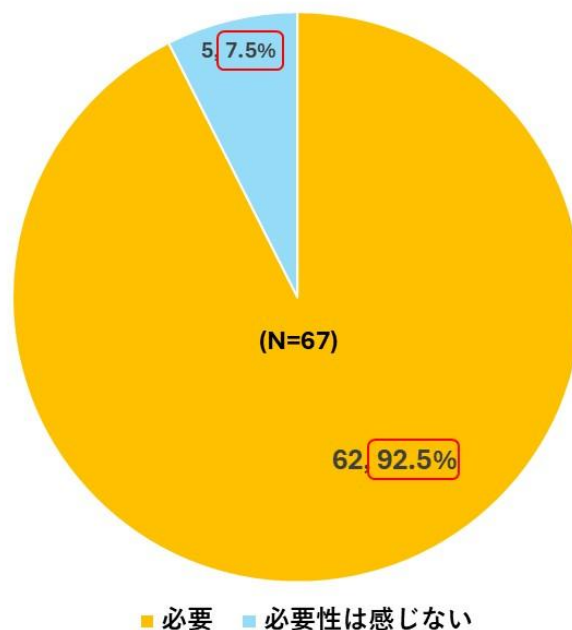


図17 原因不明疾患（臨床検体）におけるNGS解析の利用について、
統一的な検査マニュアルの必要性について

厚生労働行政推進調査事業費補助金（健康安全・危機管理対策総合推進事業）
分担研究報告書

原因不明疾患におけるゲノム解析法の構築に関する研究

研究協力者 江原 勇登 埼玉県衛生研究所 ウイルス担当

研究要旨

網羅的ゲノム解析ツールである MePIC、PaHuM、CZ ID を比較し、PaHuM および CZ ID が MePIC の後継解析ツールとなり得るか検討した。MePIC により病原ウイルスゲノムが検出された 3 検体の NGS データを用いて、PaHuM および CZ ID による追加解析を実施し、各解析ツールで検出されたウイルスゲノムのリード数を比較した。その結果、3 検体中 2 検体では、3 つの解析ツールすべてで同等のリード数が得られた。残りの 1 検体ではリード数に若干の差異がみられたものの、いずれのツールでも目的とする病原ウイルスを検出できた。さらに、JIHS 国立感染症研究所が新たに開発した PATHDET と、PaHuM および CZ ID を、C 型インフルエンザウイルスをスパイク添加した検体を用いて比較したところ、リード数には多少の違いがあったものの、いずれのツールも目的とする病原ウイルスを検出した。以上より、これらの解析ツールはいずれもメタゲノム解析ツールとして高い相互信頼性を有すると考えられた。

A. 研究目的

次世代シーケンサー(以下NGSという。)を用いた原因不明疾患における網羅的解析は、健康危機管理を担う公的検査機関として非常に重要である。これまで国立感染症研究所ゲノム解析研究センターが開発した網羅的ゲノム解析ツールである MePIC により解析を実施していたが、その解析システムは2023年に廃止になったことから、後継となる解析ソフトウェアが必要となっていた。そこで、MePIC の開発者が独立後に新規に開発した PaHuM と、国立感染症研究所や地方衛生研究所で解析実績のある海外の解析プラットフォームの1つである CZ ID、さらに JIHS 国立感染症研究所で新たに開発した PATHDET と解析結果を比較し、比較検討した。

B. 研究方法

研究1 不明ウイルス感染症等 3 検体に

おける解析ツール(MePIC, PaHuM, CZ ID)の比較

2023 年に、埼玉県の感染症重大事案対策事業として当所に搬入された 15 歳以下の急性脳炎・脳症、無菌性髄膜炎及び不明ウイルス感染症等 6 症例 23 検体のうち、NGS データを MePIC により解析し、病原ウイルスゲノムを検出した 3 検体(検体 1～3) の NGS データを用いた。3 検体の NGS データを、PaHuM 及び CZ ID で追加の解析を行い、検出したウイルスゲノムのリード数をそれぞれの解析ツール間で比較した。

なお、NGS 検査におけるライブラリーキットは、SMARTer Stranded RNA-Seq Kit HT(タカラバイオ)を使用し、AMPureXP (BeckmanCoulter)で精製後、MiSeq Reagent Kit v3 150bp (Illumina)でシングルエンドシーケンスを行った。なお、PATHDET は現在ペアエ

ンドシーケンスのみ対応のため、解析していない。

研究2 C型インフルエンザをスパイク添加した検体における解析ツール(PATHDET,PaHuM,CZ ID)の比較

健康な検査担当者の鼻腔ぬぐい液を検体とし、ここにC型インフルエンザのウイルス培養液を添加した。核酸抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使用し、得られたRNAはSMART-Seq Total RNA Mid Input (タカラバイオ)でライブラリー調整し、iSeq 100 (Illumina)を用いてペアエンドシーケンスを実施した。得られたNGSデータをPATHDET、PaHuM、CZ IDの3ツールで解析し、ウイルス分類、検出リード数、フィルタリング工程の挙動、ホスト配列除去性能など複数の観点から比較した。

(倫理面への配慮)
本研究は、埼玉県感染症重大事案対策事業の一環として実施した。データの学術的利用については埼玉県衛生研究所倫理審査委員会の審査を受け、許可を得た(承認日:2018年8月29日)。

D. 研究結果

研究1 不明ウイルス感染症等3検体における解析ツール(MePIC, PaHuM, CZ ID)の比較

① 検体1

MePICでは全ウイルス47リードのうち4リード(9%)からムンプスウイルスを検出、PaHuMでは全ウイルス132リードのうち4リード(3%)ムンプスウイルスを検出、CZ IDでは全ウイルスリード数はカウントされないが、ムンプスウイルスが4リード検出した。MePIC、PaHuM、CZ IDの全ての解析ツールでムンプスウイルスを4リード検出した(表1)。

② 検体2

MePICでは全ウイルス8,937リードのうち9リード(0.1%)からパラインフルエンザ3型を検出、PaHuMでは全ウイルス6,055リードのうち9リード(0.1%)パラインフルエンザ3型を検出、CZ IDでは全ウイルスリード数はカウントされないが、ライインフルエンザ3型を9リード検出した。MePIC、PaHuM、CZ IDの全ての解析ツールでパラインフルエンザ3型を9リード検出した(表2)。

表2 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較(検体2)

解析ツール	全リード数	全ウイルス	パラインフルエンザ3型ウイルス	その他のウイルス
MePIC	2,926,738	8,937	9	8,928
PaHuM	2,926,738	6,055	9	6,046
CZ ID	2,926,738		9	

③ 検体3

MePICでは全ウイルス1,136リードのうちヒトヘルペスウイルス6が57リード(5%)、ヒトヘルペスウイルス6Bが1,048リード(92%)を検出、PaHuMでは全ウイルス1,142リードのうちヒトヘルペスウイルス6Aを12リード(1%)、ヒトヘルペスウイルス6Bを1,098リード(96%)検出、CZ IDでは全ウイルスリード数はカウントされないが、ヒトヘルペスウイルス6を含む突発性発疹ウイルス(Roseolovirus)が1,063リード検出した。リード数は異なるものの、MePIC、PaHuM、CZ IDの全ての解析ツールでヒトヘルペスウイルス6A及びヒトヘルペスウイルス6Bを含むヒトヘルペスウイルス6を検出した。

表3 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較(検体3)

解析ツール	全リード数	全ウイルス	ヒトヘルペスウイルス6	ヒトヘルペスウイルス6A	ヒトヘルペスウイルス6B	突発性発疹ウイルス	その他のウイルス
MePIC	5,426,312	1,136	57		1,048		31
PaHuM	5,426,312	1,142		12	1,098		32
CZ ID	5,426,312					1,063	

研究2 C型インフルエンザをスパイク添加した検体における解析ツール(PATHDET,PaHuM,CZ ID)の比較

① PATHDET

PATHDETでは、総リード数927,638、フィルタリング後リード数857,844、ホス

表1 各ゲノム解析ツールによるリード数の比較(検体1)

解析ツール	全リード数	全ウイルス	ムンプスウイルス	その他のウイルス
MePIC	711,316	47	4	43
PaHuM	711,316	132	4	128
CZ ID	711,316		4	

た。その内、3,497 リードをウイルス配列と判定し、C 型インフルエンザ由来の配列を 8 リード(全ウイルスリード数の 0.23%) 検出した。

② PaHuM

PaHuM では、総リード 927,638、フィルタリング後リード数 915,470、ホストゲノム除去後リード数 564,938 であった。その内、126 リードをウイルス配列と判定し、C 型インフルエンザ由来の配列を 9 リード(全ウイルスリード数の 7.1%) 検出した。

③ CZ ID

CZ ID では、総リード 927,638、フィルタリング後リード数 823,690、ホストゲノム除去後リード数 414,178 であった。ウイルス由来配列の総数は不明だったものの、C 型インフルエンザを 16 リード検出した(表 4)。

表 4 各工程の検出リード数の比較

項目	PATHDET	PaHuM	CZ ID
総リード数	927,638	927,638	927,638
フィルタリング後リード数	857,844	915,470	823,690
ホスト除去後リード数	460,482	564,938	414,106
ウイルス総リード数	3,497	126	—
C 型インフルエンザリード数	8	9	16

D. 考察

研究 1 では MePIC と PaHuM で比較すると、全ウイルスリード数に違いが見られたことから、解析リードの真核生物、細菌、ウイルスへの分類能には差が見られると考えられた。病原ウイルスのリード数については、検体 1 ではムンプスウイルス、検体 2 ではパラインフルエンザウイルス 3 型がそれぞれ同じリード数検出したが、検体 3 ではヒトヘルペスウイルス 6 を検出したものの、リード数やウイルス名の表記名は異なっていた。このことからリード数が増えると解析ツールによる誤差が見られることが示唆されたものの、大きな差はなく、全ての解析ツールで目的とする病原ウイルスを同様な信頼性で検出できる

と思われた。

研究 2 も同様で、3 ツールすべてで目的のウイルスを検出できたことから、いずれも病原体検出ツールとして一定の信頼性を有していると考えられた。一方で、フィルタリング後のリード数やホスト配列の除去性能などに違いが見られ、解析ツールの選択が結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究は研究 1 及び研究 2 を合わせても 4 検体のみを対象としており、複数病原体混在や微量病原体検出、実際の臨床検体の解析といった実運用で想定される状況を十分に再現できていない。今後、より複雑な検体を用いた多面的な検証が必要であると考えられた。

E. 結論

本研究により、PATHDET、PaHuM、CZ ID の 3 ツールは、いずれも病原体検出能力を有することが確認された。特に行政的観点からは、解析の透明性やツールの持続的な利用可能性を考慮した上で、PATHDET を中心に活用しつつ、複数ツールを組み合わせる形で解析体制を強化することが望ましい。今後は、より多様な検体条件で解析を実施し、健康危機管理に必要な迅速・高精度な網羅的解析体制の構築に向けてデータの蓄積・共有を進めていくことが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

江原 勇登、小暮 栞、遠藤 昇里、今泉

晴喜、黒沢 博基、濱本 紀子、猪野 翔一朗、大阪 由香、貞升 健志、富岡 恭子、尾関 由姫恵、岸本 剛、本多 麻夫「原因不明疾患検査における次世代シーケンサー解析法の比較検討」第 37 回日本臨床微生物学会総会・学術

集会、千葉、2026.2.13－15

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