

地方衛生研究所における次世代シーケンサーの利用と課題

貞 升 健 志^a

(外部機関査読者：塚越 博之^b)

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を契機に、次世代シーケンサー（NGS）が全国の地方衛生研究所（地衛研）で配備され、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の変異株解析等で活用されている。NGSのそれ以外の具体的な利用法としては、臨床検体の網羅的な病原体解析、病原体の詳細な遺伝子解析等が想定される。地衛研を取り巻く状況として、感染症予防計画等を踏まえた健康危機対処計画が策定されている。微生物分野の健康危機事例発生時の病原体検査は地衛研において必須となり、従来の検査法に加え、NGSの効果的な活用を標準化していかなければならない。一方で、まだまだNGSに関するインフラ、技術、予算および人材育成面での課題は山積している。特に、網羅的解析等に係るソフトウェア、パルスフィールドゲル電気泳動法としての代替法としての利用、集積したゲノム情報の活用等、地衛研として解決すべき課題は多い。本稿では、地衛研におけるNGS解析法の使用法を紹介するとともに、地衛研が抱える課題について考えてみたい。

キーワード：次世代シーケンサー，地方衛生研究所，利用，解析

はじめに

次世代シーケンサー（next-generation sequencer: NGS）を利用した解析は、専用機器や試薬を使用し、DNA または RNA サンプルに含まれる塩基配列（連続する長鎖）を取得する技術である。地方衛生研究所（地衛研）の微生物分野では、病原体の全ゲノム解析を意味している。従来のウイルス分野における遺伝子解析や、細菌分野におけるMultilocus Sequence Typing (MLST) では¹⁾、コンベンショナルPCRにより目的遺伝子領域を増幅し、その部分の配列を解析するサンガー法²⁾が用いられてきた。しかしながら、サンガー法では解析領域が数百～1,000塩基程度であるのに対し、NGS解析では数万～数百万塩基と、サンガー法よりも著しく長い遺伝子領域を解析対象としている。

NGS解析は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を契機に、多くの地衛研で配備され、NGS利用が活発化した。が、まだまだインフラ、技術、予算および人材育成面での課題が山積している。本稿では、地衛研におけるNGS解析法の使用法や地衛研が抱える課題について考えてみたい。

1. 地衛研における検査への具体的な活用

地域保健法の改正により、地衛研は法制化され³⁾、感染症予防計画等を踏まえた健康危機対処計画の策定により、地衛研における微生物分野の健康危機に関する業務は必然となった。地衛研の健康危機対処計画では⁴⁾、国立感染

症研究所（感染研）で作られた検査法（公定法）を1ヶ月以内に最大限の検査数に持っていく事が求められる。一方、COVID-19以外にも小さな感染症危機事例はほぼ毎年発生しており⁵⁾、そのような健康危機の場合には、必ずしも感染研からの検査法の通知を待つことだけに頼る訳にはいかず、まずは地衛研が独力で危機に立ち向わなければならない場合が想定される。そのためには、地衛研独自の創意工夫が必要であり、NGS解析はそのような感染症危機管理対応に欠かせない有用な手段となりうる。

2. 臨床検体とNGS

臨床サンプルを直接の材料にしたNGS解析には、感染原因の病原体がわかっている場合とそうでない場合での使用法がある。感染原因の病原体がわかっている場合においても、ターゲットとする病原体をPCRで増幅しNGSを行う場合やそのままNGSを実施する場合に分かれる。

1) 感染原因の病原体がわかっている場合（新型コロナウイルス）

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のゲノム解析では、SARS-CoV-2に対する特異的なPCRで全ゲノムを増幅し、NGS解析を行う。2020年になって本邦で広がったCOVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2はRNAウイルスである。当センターでは当初、臨床検体からのSARS-CoV-2 RNA塩基配列を直接読む方法（RNA-Seq）を試みたが⁶⁾、全ゲノム獲得には至らなかった。臨床検体から抽出し、そのままRNAウイルスのゲノム解析では、リアルタイム

^a 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 群馬県衛生環境研究所

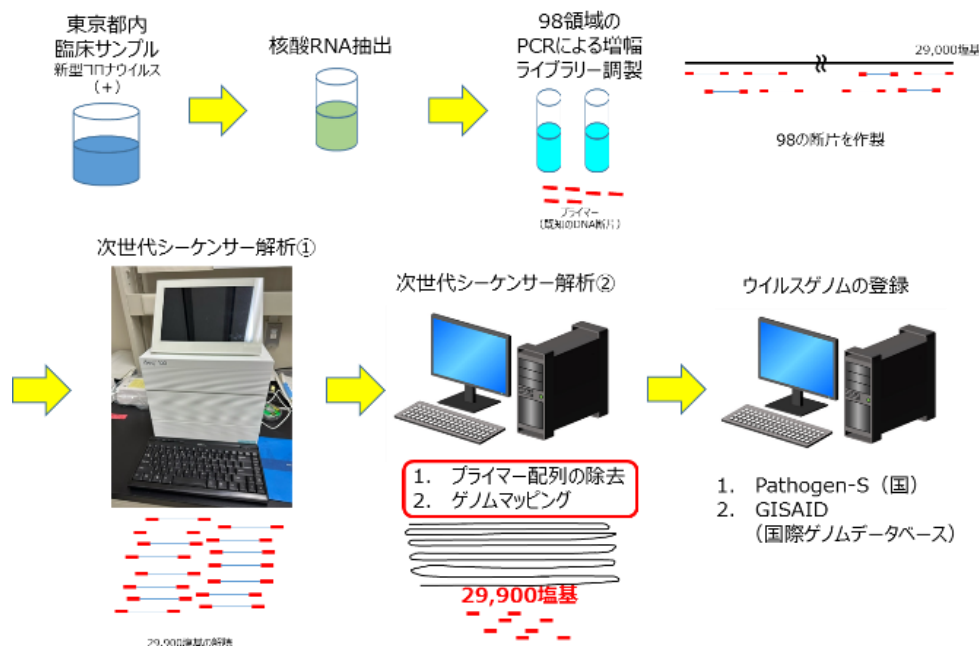


図1. 臨床検体中の新型コロナウイルスの次世代シーケンサーによる解析法（PCR増幅による場合）

PCRで30サイクル未満の検体でも困難であった。世界的に98種のプライマーで増幅してアンプリコンを作成し（図1）、全ゲノム解析する手法が世界的に標準的な方法となり、当センターを含めて都道府県ほぼ全ての地衛研が本法で検査を実施している⁷⁾。

一方で、プライマー配列が合致しないと増幅せずにその後、塩基の読み取りができない場合が出てくるため、変異の多いウイルス（変異株）ではその都度の修正が必要となる⁸⁾。また、PCRで増幅する場合においてもリアルタイムPCRにおいてCt値が30サイクル未満と比較的ウイルス量の多い臨床検体の方がNGS解析には適している。

アンプリコンのNGSの場合、PCRを行うプライマーペアを多く使用すると、プライマーの及ぼす影響（プライマー配列が全ゲノムに反映されること）が無視できなくなるため、プライマーを排除する操作が必要になる。地方衛生研究所におけるゲノム解析においては、感染研のプラットフォームを用いて（COG-JPシステム、PathoGenS）、プライマーの除去操作等を行っている。今後、他のウイルス感染症等でアンプリコンを用いNGS解析を行う場合には、それぞれでプライマー配列を抜く作業をソフトウェアベースで構築する必要がある。

2) 感染原因の病原体が判明している場合（エムボックスウイルス）

エムボックスは、エムボックスウイルス（MPXV）を原因とする発疹性の疾患である。MPXVはDNAウイルスであり、ウイルスゲノム長が約20万塩基と長い。多くの検体は発疹部分を材料とし、発疹部分のMPXVウイルス量は多く、ウイルス量が十分にある材料では、臨床検体から抽出したDNAを用い全ゲノム解析が可能である。なお、東京都健康安全研究センターでは、取得したデータをCLC Genomics Workbench（QIAGEN）でマッピングし解析して

いる。

2022～2023年にエムボックスは東京都内で173例、全国で232例報告されているが⁹⁾、MPXVのゲノム配列の登録は東京都から54株、大阪府から1株登録されているに過ぎず、この期間における我が国におけるMPXVの全容が解明されているとは言い難い。

3) 原因不明疾患のNGS解析（網羅的解析）

原因不明の感染症の際に、採取された臨床検体の全核酸の中の病原体ゲノムを検索する手法である。2023年のオズウイルス感染症の発見はまさしくNGS解析の結果によるものであり、茨城県衛生研究所の果たした役割は極めて大きい¹⁰⁾。臨床検体全ての核酸を抽出後、NGSデータを採取し、パーソナルコンピュータ（PC）を用いた解析で病原体ゲノムを検索する。ある意味では理想的な検査と思えるが、ターゲットの選択性に乏しいため、病原体の検出感度は低く、目的とするウイルス量が少ない場合には、検出が困難な場合も想定される。また、オズウイルスの検索は、感染研のMePIC v2.0（GenEpid-Jデータベース）¹¹⁾を用いた検索で発見されたが、2024年現在、そのMePICの使用は不可となっている。MePICの重要な点としては、臨床由来サンプル中のヒトゲノム配列の削除と検索にあった。ヒトゲノム配列は個人識別符号に位置付けられることから、後継となる解析ソフトウェアが必要である。

3. 分離株とNGS

NGS解析の場合には、解析したい核酸が十分量かつ高い純度が必要である。そのため、細菌であってもウイルスであっても、分離株はNGS解析に適している。ただし、ウイルスはゲノム長が1-20万塩基長であるのに対して、細菌ゲノムは10～100倍以上長い（大腸菌の場合：480万塩基）、使用する検査試薬は異なる。また、細菌における研

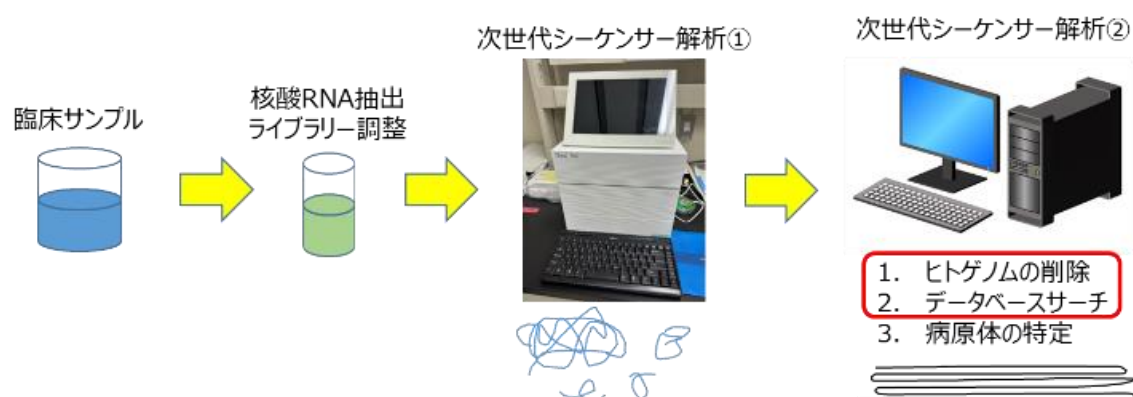


図2. 次世代シーケンサーによる原因不明疾患の解析法

究目的によっては、染色体とプラスミドに分けて解析することもあり、特に、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）等でのプラスミド解析が例として挙げられる¹²⁾。細菌においては、全ゲノム情報の利用により、一塩基レベルでの変異の有無（1塩基多型，SNP）が判定可能となり¹³⁾，集団感染事例等における感染リンクの推定，クラスター解析や感染源の推定が高い精度で可能である。しかしながら，SNP解析についての具体的な解析手法は統一化されているとはいえない。これまでは，集団発生事例の場合，菌株の制限酵素によるバンドパターンを比較するパルスフィールドゲル電気泳動（Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）法でのバンド数の違いが用いられてきたが，既にPFGE機器の販売は終了し，サポートも2023年末で終了（予定）とされている。塩基配列解析に基づく Multi-locus sequence typing (MLST) 法は，識別能がPFGE 法と比べやや劣ることが課題であったことから，NGSによるPFGEからの代替が期待されている。

4. NGS の解析のためのハード・ソフト環境

NGSの解析は俗にWet（ウェット）と呼ばれる試薬などを使った実験室での作業とDry（ドライ）と呼ばれるPCを使用した作業に分かれる。Dryな作業では，PCのスペック（高性能処理等）のみならず，通信環境（外部接続・速度），解析ソフト，解析者のスキル等が必要な要素となる。解析ソフトも様々ある。市販のソフトウェアには当センターも使用するCLC Genomics Workbench等の代表的なソフトがあるが，高価で，毎年ソフトの使用料を支払うものが多い。一方，フリーソフトも充実しているが，多くのデータ解析はLinux/Unixベースであり，専門的な知識も必要となる。

前述のMePICように感染研等でのWebベースでの解析サイトは初心者にとって大変便利ではあるが，感染研のメンテナンス作業負担は大きく，Webベースの解析サイトは多くはない¹⁴⁻¹⁶⁾。NGS解析の継続のためには，地衛研で解決すべき大きな課題となっている。

5. NGSによるゲノム情報の活用

NGSで解析したデータは（ドラフトゲノム等を含む），DDBJ等の遺伝子データバンクに登録することで，公表かつ共有性を高めることができる。登録時のアクセッション番号は，論文執筆時に重要な要素であるが，リアルタイムの疫学的なデータの活用性から考えると，どこでどのような病原体が流行しているのかを把握する手立てにも活用すべきである。ゲノム解析はコスト高であり，いつでも検査が可能な地衛研はそれ程多くはない。国レベルで一括して実施や地域ブロック毎の実施等，様々な解決策を模索する時期に来ている。

ゲノムデータが地域別，時系列的に最も使用されているのは，国際ゲノムデータベースのGISAID（Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data）に登録されたデータといえる¹⁵⁾。GISAID登録データには，SARS-CoV-2，MPXV，インフルエンザウイルス，RSウイルス，アルボウイルス（デングウイルス，チクングニアウイルス，ジカウイルス）が登録されており，それらのデータを検索するソフトウェアも充実している。どこでどのようなウイルスが検出され，似たようなウイルスの存在を全世界で検索することが可能となっている。残念ながら，GISAID以外のデータベースでは，登録し，アクセッション番号を得ること以外に活用方法を見出すことはなかなか難しい。

国際ゲノムデータベースとはいかずとも，健康危機管理に携わる地衛研全体で共有できるナショナルデータシステムが我が国にあれば，健康危機管理上この上ないツールとなりうるが，現状では存在しないことが課題である。日本としてゲノム解析データを共有し，都道府県が健康危機管理時に利用・活用・公開できる体制を国を含めて構築していく必要がある。

6. 今後のNGS解析

前述したように，NGSの検査を行う上では，ハード面とソフト面での継続的な充実強化が必要である。Wetな作業面では，COVID-19対策でNGS機器はかなり整備され，多くの消耗品の予算も以前よりは捻出可能になったものと思

われる。しかしながら、COVID-19後のNGS検査には継続的な予算措置が必要であり、すでに感染症検査の一部となっていることから、行政側に伝え続ける必要がある。

一方で、Dryな作業面では、感染研のWebサイトの使用が困難となったことから（SARS-CoV-2を除く）、地衛研個々におけるPC環境をはじめとした充実強化が必要である。特に、市販のソフトウェアは非常に高額であり、サブスクリプション契約によるものも多い。Linux/Unixベースでのフリーソフトは多いが、初心者が簡単に扱えるものではなく、また、精度保証等の面でブラックボックス的な要素も多いため、地衛研全体でソフトウェアの使用を考え、バックアップする考え方も必要となると思われる。すなわち、基本的なWetな作業のマニュアル化、Dryに関わるソフトウェアの使用法の明示・研修等である。

さらに、トータル的なものの考えとして、地衛研個々で手に負えない解析の場合には、ブロック毎の核となる地衛研や全国の地衛研がサポートできる協働体制の構築も含まれる。

今後、これらの積み重ねができれば、地衛研個々の専門的人材の育成に繋がり、次の健康危機管理対策では、万全を期して、健康危機対処計画に則り、地衛研の底力を発揮できるものと考えている。

文 献

- 1) Akase S, Yokoyama K, Obata H, *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **75**, 199–201, 2022.
- 2) 岡田若葉, 原田幸子, 糟谷 文, 他: 東京健安研セ年報, **74**, 81–87, 2023.
- 3) 厚生労働省, 感染症法等の改正を踏まえた保健所, 地方衛生研究所等の強化について,
<https://www.mhlw.go.jp/content/10901000/001040032.pdf>
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 4) 厚生労働省 健康局健康課 地域保健室, 地方衛生研究所における健康危機対処計画（感染症）策定ガイドライン,
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001117655.pdf>
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) 貞升健志: 東京健安研セ年報, **74**, 13–22, 2023.
- 6) Nagashima M, Kumagai R, Yoshida I, *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **73**, 320–322, 2020.
- 7) 林 真輝, 山崎貴子, 長島真美, 他: 東京健安研セ年報, **72**, 73–79, 2021.
- 8) 林 真輝: 東京都微生物検査情報, **42**(12), 3–4, 2021.
- 9) 東京都感染症週報,
<https://idsc.tmph.metro.tokyo.lg.jp/weekly/>
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 峰 宗太郎, 宮本 翔, 片岡紀代, 他: 初めて診断されたオズウイルス感染症患者, 病原微生物検出情報 (*IASR*), **44**, 109–111, 2023.
- 11) Takeuchi F, Sekizuka T, Yamashita A, *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **67**, 62–65, 2014.
- 12) Ariyoshi T, Aoki K, Kubota H, *et al.*: *Microbiol Spectr.* **10**:e0144922, 2022.doi:10.1128/spectrum.01449-22.
(2024年9月27日現在)
- 13) Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, *et al.*: *PLOS ONE*, **7**(11): e49651, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0049651.
(2024年9月27日現在)
- 14) 黒木絢士郎: 東京都微生物検査情報, **45** (4), 6–8, 2024.
- 15) CGE (Center for Genomic Epidemiology),
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 16) Galaxy, <https://usegalaxy.org/>
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 17) GISAIID, <https://www.epicov.org/epi3/frontend#1dd072>
(2024年9月27日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

Utilization and Challenges of Next Generation Sequencers in Japan Association of Public Health Institutes

Kenji SADAMASU^a

(Reviewed by Hiroyuki TSUKAGOSHI^b)

With COVID-19, next-generation sequencers (NGS) have been deployed at Japan Association of Public Health Institutes (JAPHI) nationwide, and are being used for genetic analysis of variant strains of SARS-CoV-2. Other specific uses of NGS include comprehensive pathogen analysis of clinical specimens, detailed genetic analysis of pathogens, and various other applications. With the establishment of the health crisis response plan based, work related to health crises in the field of microbiology at JAPHI has become a necessity, and the effective use of NGS must also be standardized. On the other hand, there are still many challenges in terms of infrastructure, technology, budget, and human resource development. In particular, there are many issues that need to be resolved at JAPHI, such as software for comprehensive analysis, the use of pulsed-field gel electrophoresis as an alternative method, and the utilization of accumulated genomic information. In this paper, we introduce the use of NGS analysis methods at JAPHI and discuss some issues that NGS analysis is facing.

Keywords: Next Generation Sequencer, Japan Association of Public Health Institutes, how to use, Analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences