

2022年4月19日放送

次世代シーケンスを活かしたウイルス感染症診療

日本大学 小児科学
准教授 伊藤 嘉規

感染症診療において、急性期に病原微生物を特定することは、適切な抗微生物薬の使用を可能にすることから、特に重症感染症では、非常に重要な診療行為の一つと言えます。本日は、次世代シーケンス技術の特長を紹介し、その臨床応用の可能性について、ウイルス感染症診療を例に説明したいと考えています。

感染症診断において、多くの急性感染症では、病原微生物診断は、現在でも不十分であると言えます。私たちがよく診療する肺炎では、その20%程度の症例では、病原微生物は同定できません。髄膜炎・脳炎・脳症では、病原微生物が特定できない症例の方が多く、敗血症・肝不全・心筋炎などの重症感染症でも、病原微生物診断には苦労します。感染症は重症なほど、早期診断と適切な抗微生物薬の選択が予後を左右します。一方、病原微生物は、細菌・ウイルス・真菌などにわたり、その数も多く、複数の検査を平行して行いながら病原微生物の同定を試みる場合が多いにも関わらず、十分な結果が得られるとは限りません。次世代シーケンス法は、一度のアッセイで、1,000万～10億程度のリード（DNA・RNA断片のシーケンス数）配列情報を得ることができ、臨床検体中の核酸断片を網羅的・定量的に解析することができます。そのため、解析検体中のマイクロバイオーム、病原微生物の薬剤耐性遺伝子、ウイルスの変異株特定も同時に解析可能など大きな特徴があります。

次世代シーケンスによる感染症診断¹

一つのアッセイで**1,000万以上のリード（遺伝子断片情報）**
 病原体の**網羅的・定量的**な検出・同定
 同時に**薬剤耐性**の同定も可能
 培養・分離法に比べて**早期診断**が可能

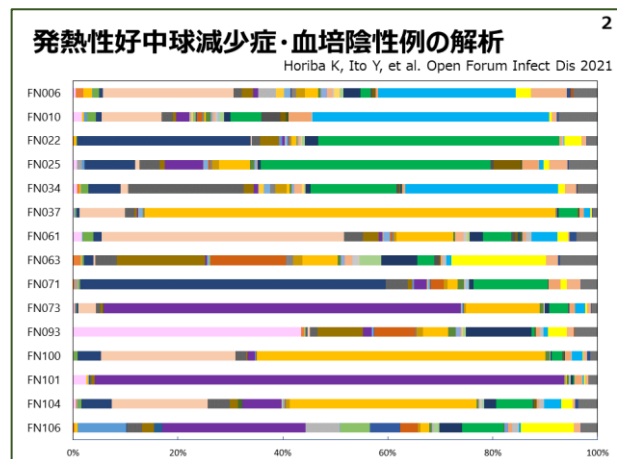
難治性で病原診断が困難な疾患に有用

核酸抽出 → シーケンス反応 → データの解析
 ライブラリー調整



<https://pathdet.hgc.jp/>
 (独自に開発)

次世代シーケンス法には、複数の手法が存在しますが、600塩基対程度の比較的短い遺伝子断片を解析するショートリード法と、網羅的に遺伝子配列を解析する手法であるメタゲノム解析を合わせた手法を使用する例から説明します。短い断片を網羅的に解析する訳です。この場合、短い断片の遺伝子情報を解析ソフトでつなぎ合わせ、全体の遺伝子情報を作成し、データベースに照合して、微生物を特定します。通常は、微生物ゲノムの全体の情報が得られることと、同じ部分の情報が多数あることから、ゲノム情報の確からしさを判断します。次世代シーケンス法を、発熱性好中球減少症の病原微生物診断に応用した例を説明します。患者さんの血液中の微生物ゲノムを網羅的に解析しますので、血液検体から、様々な微生物（主に細菌）が同定されます。すなわち、血液検体中のマイクロバイオームに関する情報が得られます。この中で、多くのゲノム量があり、占有度の高いものを病原微生物と判断します。培養検査や、特定の微生物を検出するための分子生物学的な方法に比べて、微生物に関するかなり多くの情報が、一つの手法で得られることが大きな利点です。

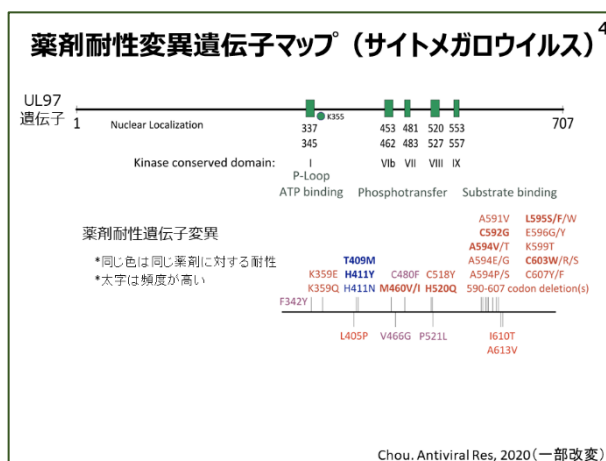


次に、網羅的に解析できる利点を別の研究を紹介しながら説明します。髄膜炎・脳炎・脳症などの中枢神経感染症では、病原微生物を解析するために髄液検体や血液検体を使用されます。この後ろ向き臨床研究では、中枢神経感染症を疑われた1歳未満の小児を対象としました。23症例で、保存されていた髄液検体を次世代シーケンスで解析しました。診療時点では、頻度が比較的高く、調べやすい単純ヘルペスウイルスやヒトヘルペスウイルス6型などは調べたのですが、病原微生物は検出されていませんでした。次世代シーケンスで調べた結果、約半数の12症例で病原微生物候補であるウイルスを検出しました。検出されたウイルスの多くは、エンテロウイルスB、パレコウイルスAでした。血清タイプとしては、コクサッキーウイルスB5、エコーウイルスE7、ヒトパレコウイルス3などです。これらのウイルスは、中枢神経系感染症の原因としてよく知られており、今回の検討症例でも、年齢や感染症の流行状況から、病原微生物として想定されていたと考えられます。一方、これらのウイルスは、特異的なPCR検査が行われにくく、培養での検出率が低いことが言えます。次世代シーケンス法の応用により、病原微生物診断が向上することが示唆されます。

髄液検体を用いた解析

患者番号	病原微生物候補	リード数	ウイルス血清タイプ
N01	Enterovirus B	19,242	Echovirus E7
N05	Primate erythroparvovirus 1	13,623	Human parvovirus B19
N13	Enterovirus B	3,901	Coxsackievirus B2
N14	Proteus mirabilis	49,284	NA
N15	Enterovirus B	937	Coxsackievirus B4
N16	Enterovirus B	6,576	Coxsackievirus B5
N17	Parechovirus A	1,650	Human parechovirus 3
N18	Enterovirus B	193	Coxsackievirus B5
N19	Enterovirus B	93	Coxsackievirus B4
N20	Enterovirus B	1,007	Coxsackievirus B5
N23	Enterovirus B	148	Coxsackievirus B5
N26	Enterovirus B	92	Coxsackievirus B4

抗微生物薬に対する薬剤耐性は、感染症診療において注目されています。薬剤耐性の解析は、通常は時間がかかり、解析できる薬剤耐性も限られているのが現状です。一方、微生物ゲノムの解析がすすみ、数多くの薬剤耐性遺伝子候補が報告されています。次世代シーケンスでは、病原微生物ゲノムの幅広い情報が得られるため、病原微生物を特定すると同時に、薬剤耐性遺伝子情報も知ることができると期待されます。私共は、サイトメガロウイルスの薬剤耐性遺伝子を網羅的に解析できないか試みました。サイトメガロウイルス感染症では、ガンシクロビルやバルガンシクロビル等の抗ウイルス薬が治療に使われますが、一部の症例で薬剤耐性が報告されています。サイトメガロウイルス感染症の治療例の多くは、重症例であり、薬剤耐性の解析は診療上、大変有用です。サイトメガロウイルスでは、薬剤耐性変異が集積している遺伝子が 2 つ知られています。UL97 と UL54 という遺伝子です。そこで、これら 2 つの遺伝子領域を増幅し、網羅的に薬剤耐性遺伝子を解析しました。この方法の利点は、24 時間以内に、報告されている薬剤耐性遺伝子を解析可能な点です。私共が独自に構築した解析系では、造血細胞移植後に抗ウイルス薬治療に抵抗性を示した症例で、UL97 および UL54 における薬剤耐性遺伝子を検出できました。新生児の重症サイトメガロウイルス感染症で、治療によるウイルス量の減少効果が遅延した症例でも、薬剤耐性遺伝子を検出しました。薬剤耐性に関しては、多くの微生物を対象とした網羅的な解析系の開発に取り組んでいます。



病原微生物ゲノムの解析情報が診療に重要な例として、新型コロナウイルス感染症が挙げられます。新型コロナウイルスは、RNA ウィルスのため、ウィルスが変異することにより新しい流行を起こします。また、ウィルス株により、重症化しやすいかどうかなどの臨床像も異なります。そのため、特に新しい流行初期には、どのようなウィルス株が流行しているのかを調べるのが重要になります。現在、新型コロナウイルス株の解析には、次世代シーケンス法が利用されています。

次世代シーケンス法を応用した解析は広がっています。感染症の病原微生物診断以外では、病態の解析を診療に活かす研究も行われています。私共が行っているものとしては、EB ウィルス関連の難治性疾患に関する研究があります。EB ウィルスは、伝染性単核症のような急性感染症だけでなく、EB ウィルス関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) などの重症疾患の原因ともなります。EBV-HLH は、EB ウィルスの初感染または再活性化に伴い、免疫に異常が起こる結果としてウィルス感染細胞を排除できず、過剰な免疫応答の結果として血球貪食を誘導し、重度の汎血球減少などを呈する疾患です。EB ウィルスが感染しているリンパ球の種類や、免疫不全をき

たす遺伝子異常の有無により、治療法の選択が異なります。現在は、それらを複数の検査法で行っていますが、次世代シーケンス法では、微生物と宿主であるヒトの遺伝子をあわせて解析することが可能なため、病気の発症早期に診療に必要な多くの情報を得ることが期待できます。このように微生物だけでなく、免疫応答や遺伝子異常の検査も同時に行える診断法になります。

次世代シーケンスには、複数の手法があります。今までは、本日の初めに紹介した短い断片を網羅的に解析する方法が主流でしたが、ロングリード法という、5,000～20,000塩基対程度を解読する手法が注目されています。長い配列の情報が得られると、結果として、微生物ゲノム全体に渡る情報が得られやすくなり、薬剤耐性の解析がやりやすくなります。また、この手法で使う機械の原理により、解析時間が短縮できる、という特長があります。次世代シーケンスは、主に重症感染症の診療に力を発揮し、実際の臨床で使用されるようになっていくと考えられます。

解析する遺伝子断片による分類	読み取る遺伝子部位による分類	シーケンスリー	検出する微生物種	薬剤耐性遺伝子	病原微生物特定までの時間(DNA)	マイクロバイオーム	変異種解析(ウイルス)
ショートリード ~600bp	メタゲノム	イルミナシーケンサー等	すべて	△~○	24h~48h	◎	○
ショートリード ~600bp	ターゲット	イルミナシーケンサー等	細菌などに限定	×	24h~48h	×	△
ロングリード 5-20kbp	メタゲノム	ナノポアシーケンサー	すべて	◎	6h~	◎	◎
ロングリード 5-20kbp	ターゲット	ナノポアシーケンサー	限定	◎	12h~	×	△~○

「小児科診療 UP-to-DATE」

<http://medical.radionikkei.jp/uptodate/>