16S rRNA 遺伝子の広い領域をより高い精度で解析

2 × 500 bp のリード長で広がる抗酸菌研究の可能性



山谷 いずみ 先生
公益財団法人結核予防会結核研究所
抗酸菌部　医員



御手洗 聡 先生
公益財団法人結核予防会結核研究所
抗酸菌部　部長

はじめに

結核予防会結核研究所の抗酸菌部では、結核および非結核性抗酸菌（NTM）症の予防、診断、治療への貢献を目的として、診断法の開発および評価から基礎研究、臨床細菌学的研究、疫学調査まで幅広い研究活動を行っています。同部では、病原体サーベイランス、メタゲノム解析、薬剤耐性解析などの用途で次世代シーケンサー（NGS）を活用しており、このたび MiSeq™ i100 Series 25M Reagent Kit（1000 cycles）を導入されました。

本インタビューでは、本キットの導入背景や活用状況、得られた成果、今後への期待について、御手洗聡先生および山谷いずみ先生にお話を伺いました。

Q1. 先生方の研究内容や業務内容について教えてください。また、MiSeq i100 Plus システムをどのような用途でご活用されていますか。

結核研究所抗酸菌部では、結核および非結核性抗酸菌（NTM）症の予防・診断・治療に貢献することを目的として、細菌学的診断法の開発と評価、抗酸菌の表現型・機能・遺伝学的特性の解析、環境調査を含む基礎研究、臨床細菌学的研究、疫学調査などを行っています。

MiSeq i100 Plus システムは、主に分子疫学解析（病原体サーベイランス）、メタゲノム解析、およびターゲット NGS 解析に活用しています。分子疫学では抗酸菌分離株間の遺伝的近縁性評価に利用し、メタゲノム解析ではマイクロバイオーム解析や網羅的病原体検出を実施しています。また、結核菌における迅速かつ包括的な薬剤耐性予測に、ターゲット解析を利用しています。

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

最も期待していたのは、16S rRNA 遺伝子のより広い領域をペアエンドで解析し、菌種同定の精度と結果解釈の確信度を向上させることでした。

Q2. MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit（1000 cycles）の導入にあたり、どのような結果や成果を期待されていましたか。

最も期待していたのは、16S rRNA 遺伝子のより広い領域をペアエンドで解析し、菌種同定の精度と結果解釈の確信度を向上させることでした。

従来の短いリードでは増幅産物の一部しかカバーできず、種間の配列差が小さい抗酸菌では属レベルの同定に留まったり、近縁種の区別が困難だったりする場合がありました。本キットの 2 × 500 bp リードを用いることで、約 1,000 bp までのアンプリコンを両端から解析でき、Read 1 と Read 2 の十分な重複領域を利用した高精度なコンセンサス配列が得られます。全長 16S rRNA 遺伝子（約 1,500 bp）を一続きに読み切ることはできませんが、解析可能な領域が広がるだけでも判別可能な菌種の範囲は実際に拡大します。

現在は 16S rRNA 遺伝子解析のみに利用していますが、今後は 16S rRNA 遺伝子単独では識別が難しい菌種に対して *rpoB*、*hsp65*、ITS 領域など複数遺伝子座を組み合わせたマルチローカス解析により同定精度を高める展開を検討しています。また、*rpoB*、*katG*、*erm*（*41*）、*rrs*、*gyrA* などの薬剤耐性関連遺伝子を長いアンプリコンとして取得し、菌種同定と耐性プロファイル推定を一連のワークフローで実施する、薬剤耐性関連遺伝子の解析も視野に入れています。

Q3. 数あるソリューションの中から、本キットの購入・採用を決められた理由を教えてください。

最も評価したのは、16S rRNA 遺伝子の広い領域を高い精度で解析できる点です。

全長 16S rRNA 遺伝子の解析という観点ではロングリードシーケンサーという選択肢もありますが、1 リードあたりの精度やコスト、既存の解析環境との親和性を考慮すると、当研究所の用途にはペアエンドシーケンスによるコンセンサス配列取得の方が適していると判断しました。

また、既設の MiSeq i100 Plus システムをそのまま活用できる点も大きなメリットでした。ライブラリー調製からデータ解析までのワークフローが従来のショートリード解析とほぼ共通であるため、新たな運用負荷を最小限に抑えながら導入できました。25M の出力についても、多数サンプルを並列に処理する場合にも、単一サンプルを深く解析する場合にも十分に対応できる、バランスの取れた性能であると評価しています。

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

Q4. 実際にご使用いただいた結果はいかがでしたか。

16S rRNA アンプリコン解析では、想定していた範囲の塩基配列を取得でき、当初期待していた解析を概ね実施することができました。装置操作やラン設定についても従来のイルミナシステムと共通する部分が多く、既存ワークフローへの導入は非常に円滑でした。

一方で、長いリードを利用するうえでいくつか考慮すべき点もありました。サイクル数の増加に伴ってリード末端の品質は若干低下するものの、十分な重複領域を確保した設計であれば、コンセンサス配列作成の段階でその影響を軽減できます。ですが、片側のリードのみに依存する設計では影響を受けます。また、単一アンプリコン主体のライブラリーでは塩基多様性が低いため、PhiX スパイクインなど従来と同様の対策が必要です。さらに 1000 cycles ランでは測定時間が長くなるため、迅速性が求められる用途ではリード長とのバランスを考慮する必要があります。

ただし、これらはいずれもイルミナ SBS 技術に共通する既知の特性であり、本キット固有の問題ではありません。あらかじめ実験設計に織り込んでおけば、運用上の大きな課題にはならないと感じています。

Q5. 本キットの活用によって、研究や業務にどのような変化がありましたか。

菌種同定の結果を、従来よりも多くの塩基情報に基づいて評価できるようになりました。

特に大きな変化は、16S rRNA だけでは区別が難しい近縁菌種について、16S の解析領域を広げても判別が難しいことを、早い段階で判断できるようになったことです。その結果、*rpoB* や *hsp65* などの追加解析に進むべきかどうかを、より客観的な根拠に基づいて判断できるようになりました。

もちろん菌種同定の最終判定には、引き続き複数遺伝子座や表現型情報を組み合わせる必要がありますが、その判断プロセスをより効率的に進められるようになったことは、大きなメリットだと感じています。

Q6. 今後の製品開発に期待することはありますか。

まず期待するのは、リード長のさらなる延伸です。全長 16S rRNA 遺伝子を十分な重複領域を確保しながら解析できるようになれば、抗酸菌の菌種同定における有用性はさらに高まると考えています。

また、結核菌ゲノムには *PE/PPE* ファミリー遺伝子に代表される高 GC かつ反復性の高い領域が存在します。これらの領域は、ショートリード解析における長年の課題であり、リード長の延伸と GC バイアスの改善が両立すれば、適用可能な研究領域は大きく広がるでしょう。

さらに、長サイクルランにおけるリード末端の品質のさらなる向上にも期待しています。コンセンサス配列の信頼性に直結する要素であり、リード長の延伸と同じくらい重要な改善ポイントだと考えています。

特に大きな変化は、16S rRNA だけでは区別が難しい近縁菌種について、16S の解析領域を広げても判別が難しいことを、早い段階で判断できるようになったことです。

MiSeq i100 Series は、従来のショートリード解析に加え、1000 cycles キットを利用することで長いアンプリコン解析にも対応できる柔軟なシステムです。

Q7. 最後に、MiSeq i100 Series の導入を検討されている研究者や検査室の方々へメッセージをお願いします。

MiSeq i100 Series は、従来のショートリード解析に加え、1000 cycles キットを利用することで長いアンプリコン解析にも対応できる柔軟なシステムです。一方で、全長 16S rRNA 遺伝子を一続きに読み切るような用途では、ロングリード技術の方が適している場合もあります。

そのため重要なのは、「何を読みたいのか」を明確にしたうえで、それに最適な技術を選択することだと思います。

導入を検討する際には、対象アンプリコンの長さ、必要な検体数、ライブラリーの塩基多様性、コンセンサス配列作成に必要な重複長などを事前に十分検討することをお勧めします。これらを適切に設計できれば、MiSeq i100 Series は抗酸菌研究において非常に有用なシーケンス基盤になると考えています。



MiSeq i100 Series の情報はこちら

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル22階
Tel (03)4578-2800 Fax (03)4578-2810
jp.illumina.com
www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：jp.illumina.com/tc

© 2026 Illumina, Inc. All rights reserved.
すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. APJ-5033-260910-01-JP M-JP-00429

illumina®