



総説：感染症

イルミナテクノロジーを使用した研究論文の概要

目次

はじめに	3
概評	4
病原体の同定	5
ウイルスの同定	7
多重感染および慢性感染	9
抗生物質耐性および病原性	11
伝染病および感染	12
参考文献	15

はじめに

次世代シーケンサーテクノロジー^{1,2}は、感染症の診断および治療の改良への道を切り開く極めて強力なツールです^{3,4}。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析は、臨床所見の予備知識を必要とせずに、一つのアッセイで感染性病原体の検出と同定を可能とします。さらに同一のアッセイにより、抗生物質耐性、病原性および病原体の起源に関する情報を入手することも可能です。すべての微生物に対する普遍的なテスト法は、簡便で統一的なワークフローを提供し、しかもそのワークフローを客観的かつ操作する者の技能に左右されず、検証と制御が容易なものとなります⁵。より正確な診断および治療は、入院期間の短縮ならびにより適切な判断に基づく抗生物質の使用につながりますが、究極的には、治療レベルの改善という恩恵を受ける患者に最も大きな利益をもたらします。

本書は、感染性病原体の検出および制御における、次世代シーケンサーテクノロジーの適用と可能性を示した近年の文献をクローズアップすることを目的としています。

イルミナシーケンス技術のさらに詳しい情報に関しては、当社ウェブサイトwww.illumina.co.jpをご参照ください。

¹ Next Generation Sequencing (NGS) and Massively Parallel Sequencing MPS are often used interchangeably to refer to high throughput sequencing technologies. Sequencing by Synthesis (SBS) refers specifically to Illumina sequencing technology.

² Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. and Crook, D. W. (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 13: 601-612

³ Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30: 434-439

⁴ Sibley, C. D., Peirano, G. and Church, D. L. (2012) Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 12: 505-521

⁵ Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. and Crook, D. W. (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 13: 601-612

以下のレビューは本書の主題の概要を理解するために有用です。

Didelot, X., Bowden R., Wilson D. J., Peto T. E. and Crook D. W. (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Nat Rev Genet 13: 601-612

著者らは、現在使用されている細菌の同定およびタイピング法を、次世代シーケンサーに基づくワークフローと比較しています。そして次世代シーケンサーが近い将来十分に迅速、正確かつ安価になり、臨床微生物学の現場で日常的に使用されるようになるであろうと予測しています。臨床微生物学で現在使用されている多くの複雑な技術を、単一のより効果的なワークフローで置き換えることが可能です。本レビューではさらに、この技術の適用を目的として、各研究機関で求められる変化や、診断研究室におけるスキルミックスやインフラにも言及しています。

Loman, N. J., Misra R. V., Dallman T. J., Constantinidou C., Gharbia S. E., et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nat Biotechnol 30: 434-439

本レビューでは、市販されている3種類のベンチトップ型次世代シーケンサープラットフォームを評価しています。志賀毒素産生性大腸菌 O104:H4 の分離株のシーケンスと解析を、一般的に使用されている装置と解析パイプラインを用いて実行しています。様々なシーケンサーにより得られるシーケンスの品質が図1に示されています。

Loman, N. J., Constantinidou C., Chan J. Z., Halachev M., Sergeant M., et al. (2012) High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. Nat Rev Microbiol 10: 599-606

Sibley, C. D., Peirano G. and Church D. L. (2012) Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. Infect Genet Evol 12: 505-521

病原体の同定

従来の微生物同定法は、微生物を同定するために臨床症状およびある程度の予備知識に依存しています。中には特殊で同定が不可能なケースも存在します。海外渡航の増加に伴い、未知の熱帯病が思いもよらない場所で発生する可能性も生じています。いまだに未知の微生物が存在することおよび多くの生物に関して実験室での培養が不可能であることが、事態をさらに複雑にしています。中には、微生物が検出を完全に逃れるケースも存在します⁶。次世代シーケンサーはゲノムを直接検索し、全く新規の培養されていない生物を検出・同定し、同時に病原性や抗生物質耐性などの疫学のおよび生物学的情報を引き出すことが可能です⁷。



次世代シーケンサーでは予備知識なしに微生物の同定が可能です。

参考文献

Moore, R. A., Warren R. L., Freeman J. D., Gustavsen J. A., Chenard C., et al. (2011) The sensitivity of massively parallel sequencing for detecting candidate infectious agents associated with human tissue. PLoS ONE 6: e19838

いくつかの自己免疫疾患および数種類のタイプの腫瘍には病原菌が関連しています。本研究は、RNAウイルスの添加量を徐々に減少させたRNA-Seqライブラリーによってウイルス転写の検出レベルを決定する原理証明 (proof of principle) をしています。著者らは、中程度のシーケンス深度においても、100万分の1以下の頻度のウイルス転写が検出され得ることを見出しています。このことから、次世代シーケンサーがヒトの組織に関連した推定感染性病原体を検出するための高感度な方法であることが示されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix}

Engelthaler, D. M., Bowers J., Schupp J. A., Pearson T., Ginther J., et al. (2011) Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern AZ, USA. PLoS Negl Trop Dis 5: e1347

アリゾナ州の風土病のない地域において最近発生した類鼻疽症例は、患者に風土病の存在する地域への渡航歴および類鼻疽症の既往歴がないことから、現地において発症した感染症であると確定しました。症例の診断は、複数の微生物学的技術および分子的技法により確定されました。これは、シーケンサー技術を病原菌の同定に使用した好例です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II} による50bpペアエンドリード解析

Auburn, S., Campino S., Clark T. G., Djimde A. A., Zongo I., et al. (2011) An effective method to purify Plasmodium falciparum DNA directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing. PLoS ONE 6: e22213

Cejkova, D., Zbanikova M., Chen L., Pospisilova P., Strouhal M., et al. (2012) Whole genome sequences of three Treponema pallidum ssp. pertenue strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence. PLoS Negl Trop Dis 6: e1471

Koser, C. U., Niemann S., Summers D. K. and Archer J. A. (2012) Overview of errors in the reference sequence and annotation of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, and variation amongst its isolates. Infect Genet Evol 12: 807-810

⁶ Colvin, J. M., Jaffe, D. M. and Muenzer, J. T. (2012) Evaluation of the precision of emergency department diagnoses in young children with fever. Clin Pediatr (Phila) 51: 51-57

⁷ Sibley, C. D., Peirano, G. and Church, D. L. (2012) Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. Infect Genet Evol 12: 505-521

ウイルスの同定

ウイルス感染は症状が不明瞭であるためその診断が困難です。さらにウイルスの遺伝的変化は速く⁸、また厳密な培養条件が必要とされるため、同定はさらに困難です。最近の研究において、標準的な方法では検出されなかったウイルスを、次世代シーケンサーによって検出し同定することが可能であることが示されました⁹。この次世代シーケンサーの機能により、腫瘍¹⁰および慢性疾患¹¹におけるウイルス感染の可能性を探究することが新たに注目されています。

次世代シーケンサーは高感度であり、なおかつ予備知識を必要としないことから、ウイルスの検出および同定のための主要ツールとなるでしょう。

参考文献

Wylie, K. M., Mihindikulasuriya K. A., Sodergren E., Weinstock G. M. and Storch G. A. (2012) Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. PLoS ONE 7: e27735

著者らは、原因不明の発熱を呈する小児と発熱のない対照の小児から、176検体の鼻咽頭スワブおよび血漿サンプルを解析しました。その結果、既知のアデノウイルス、エンテロウイルスおよびロゼオロウイルス等の病原菌に加えて、未知の病原性を持つウイルスも含めた25種類のウイルス属の配列が同定されました。発熱群と無発熱群の差が最も顕著に現れたのは血漿サンプルでした。血漿サンプルからウイルスの配列が検出された場合、播種性感染と関連している可能性が考えられます。これらのデータから、ウイルス感染が原因不明の発熱に関連していることが示唆されます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Yozwiak, N. L., Skewes-Cox P., Stenglein M. D., Balmaseda A., Harris E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. PLoS Negl Trop Dis 6: e1485

著者らは、ディープシーケンスを使用して、以前に陰性と判断された症例の37%（123例中45例）でウイルス由来の配列を検出しました。これには、ヒトヘルペスウイルスの6つの配列を有する13例が含まれています。他の試料にはヘルペスウイルス科、フラビウイルス科、サーコウイルス科、アネロウイルス科、アスファウイルス科およびパルボウイルス科に属するウイルスの配列と類似した配列が含まれていました。いくつかの例ではウイルス由来の配列と推定される配列が実質的に既知ウイルスと同一である一方、他の例では分岐しており、それらは新規のウイルスに由来する可能性があることが示唆されます。これとは対照的に、Virochip解析では、以前に陰性と判断された123例のうち10例（8%）において、ウイルスの存在が推定されています。これらの結果は熱帯性熱病の研究における、既知および分岐進化したウイルスの検出への普遍的な方法の実用性を示しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II} およびHiSeq 2000。RNAおよびDNAを共精製するためのQIAamp Viral RNA Isolation Kit (Qiagen) を使用して、140mLの血清から全核酸を抽出しました。

⁸ Tapparel, C., Cordey, S., Junier, T., Farinelli, L., Van Belle, S., et al. (2011) Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. PLoS ONE 6: e21163

⁹ Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M. D., Balmaseda, A., Harris, E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. PLoS Negl Trop Dis 6: e1485

¹⁰ Jiang, Z., Jhunjhunwala, S., Liu, J., Haverty, P. M., Kennemer, M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. Genome Res 22: 593-601

¹¹ Kriesel, J. D., Hobbs, M. R., Jones, B. B., Milash, B., Nagra, R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. PLoS ONE 7: e31886

Conway, C., Chalkley R., High A., MacLennan K., Berri S., et al. (2012) Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. J Mol Diagn 14: 104-111

この研究では、FFPE試料として保存されている様々な異なるタイプの腫瘍におけるウイルス感染に関して、次世代シーケンサーを使用して検討しています。著者らは、従来の方法では検出されなかったと思われるHPVサブタイプの検出に成功しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer

Nishijima, N., Marusawa H., Ueda Y., Takahashi K., Nasu A., et al. (2012) Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultradeep sequencing. PLoS ONE 7: e35052

抗ウイルス治療に関連するB型肝炎ウイルス（HBV）の遺伝的不均一性を明らかにするために、著者らは19人のウイルス性慢性肝炎患者の肝臓および血清に存在するHBVの全ゲノムに関する超ディープシーケンスを行いました。抗ウイルス薬治療に耐性のクローンが初回治療患者の肝臓および血清に広く見出されたことから、薬剤耐性を発症するリスクの可能性が示唆されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Yongfeng, H., Fan Y., Jie D., Jian Y., Ting Z., et al. (2011) Direct pathogen detection from swab samples using a new high-throughput sequencing technology. Clin Microbiol Infect 17: 241-244

この文献では、スワブからのウイルスの検出および同定が報告されています。著者らは、先験的知識なしでインフルエンザA（H1N1）および季節性インフルエンザA（H3N2）ウイルスの配列同定に成功しています。このようなアプローチは、新興の感染症の診断のための貴重なツールとなり得ます。

イルミナ技術：Genome Analyzer

Flaherty, P., Natsoulis G., Muralidharan O., Winters M., Buenrostro J., et al. (2012) Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. Nucleic Acids Res 40: e2

著者らは、わずか0.1%の割合で存在する変異を確実に検出することが可能であることを示しています。これは、1,000個の野生型アレルあたり1個の変異を正確に検出できることを意味します。稀な変異を検出する方法として、複数のリファレンス複製から得られるベースラインのエラー率を各位置においてサンプルのエラー率と比較します。この方法の有用性を示すために、著者らはH1N1型インフルエンザAの臨床サンプル9検体を解析し、H1N1のノイラミニダーゼ遺伝子においてオセルタミビル（抗ウイルス治療薬）耐性変異を0.18%の割合でサンプルに検出しました。

イルミナ技術：Genome Analyzer

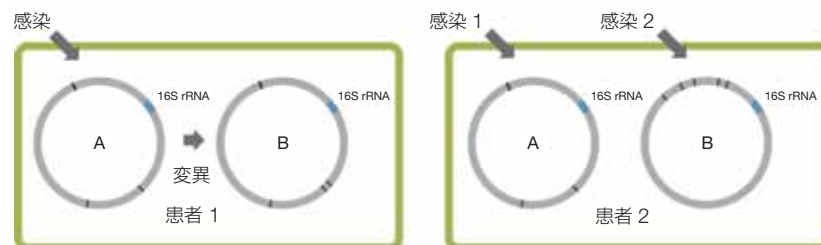
Kriesel, J. D., Hobbs M. R., Jones B. B., Milash B., Nagra R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. PLoS ONE 7: e31886

Jiang, Z., Jhunjhunwala S., Liu J., Haverty P. M., Kenner M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. Genome Res 22: 593-601

多重感染および慢性感染

再発性の感染症は、根本の原因が未知である場合には、管理が困難になる可能性があります¹²。再発性の疾患が患者の体内に保有されている未治療の微生物に起因するものであるのか、それとも患者が外部の感染源にさらされたのか、という疑問が生じ、この疑問に対する答えによって、患者の治療および感染の制御の方法が根本的に異なってきます。

感染の過程において、微生物は宿主の反応や臨床的治療に適応して変異を獲得します¹³。慢性感染症における抗生物質耐性の発現はその一例です¹⁴。その結果、自然感染の感染症には複数のクローンが含まれる可能性があります。逆に、クローンの存在は感染症が再発性であることを意味している可能性もあります¹⁵。次世代シーケンサーでは微生物の高精度の遺伝子地図を供給することができるため、これら2つの可能性を容易に区別することが可能となります¹⁶。微生物のシーケンスにより、さらに抗生物質耐性の発現および病原性に関する知見もたらされます¹⁷。



患者1においては単回の感染後、微生物の進化に起因する2種類のクローンタイプが生じる可能性があります。これらのクローンは高度に相同的で、その差はゲノムのいずれかの位置におけるわずか1塩基の変異によるものである場合もあります。患者2においては、クローン間に複数の独立した差が存在します。これは複数回の感染に起因する可能性があります。複数のクローンの存在は感染症のコントロールにおいて臨床的に重要です。

グラム陽性およびグラム陰性の重要なヒト病原菌のいくつかは、形質転換を行うことが可能です¹⁸。遺伝子形質転換とは、細胞が環境からDNAを取り込みそのシーケンスを細胞自身のゲノムに組み込む過程です¹⁹。形質転換が臨床的に重要な機構である理由は、例えば主要な呼吸器系病原菌である *Streptococcus pneumoniae* におけるワクチン回避やペニシリン耐性の発現等、細菌が臨床的介入に対して迅速に適応することを可能とするためです²⁰。クローンが臨床分野で注目を集めているのは、クローンが薬剤耐性を持つことにより治療後の耐性クローンの生存率が高まる可能性、そしてその結果として治療不全が生じる可能性があるからです。

¹² Gysin, C., Althman, G. A. and Papsin, B. C. (2000) Sinusitis in cystic fibrosis: clinical characteristics, diagnosis, and management. *Pediatr Pulmonol* 30: 481-489

¹³ Levert, M., Zamfir, O., Clermont, O., Bouvet, O., Lespinats, S., et al. (2010) Molecular and evolutionary bases of within-patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog* 6: e1001125

¹⁴ Gao, W., Chua, K., Davies, J. K., Newton, H. J., Seemann, T., et al. (2010) Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog* 6: e1000944

¹⁵ Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

¹⁶ McAdam, P. R., Holmes, A., Templeton, K. E. and Fitzgerald, J. R. (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* 6: e24301

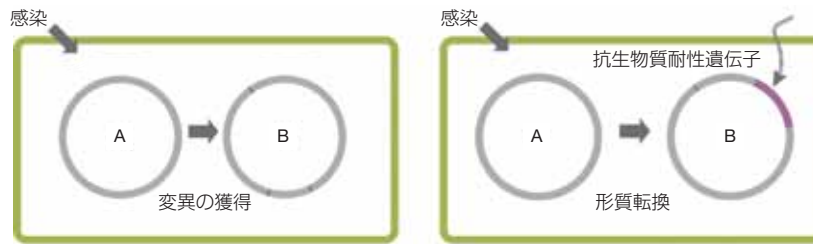
¹⁷ Sibley, C. D., Peirano, G. and Church, D. L. (2012) Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 12: 505-521

¹⁸ Johnsborg, O., Eldholm, V. and Havarstein, L. S. (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* 158: 767-778

¹⁹ Griffith, F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27: 113-159

²⁰ Croucher, N. J., Harris, S. R., Barquist, L., Parkhill, J. and Bentley, S. D. (2012) A high-resolution view of genome-wide pneumococcal transformation. *PLoS Pathog* 8: e1002745

現在使用されている方法では各クローンを同定することを可能とするマーカーの予備知識が必要であり、PCR法では存在量の少ないクローンを検出できないケースが多く存在します。



患者1においては、単回の感染後、臨床的介入に反応して進行的に変異が獲得される可能性があります。これらのクローンは高度に相通的で、その差はゲノムのいずれかの位置におけるわずか1塩基の変異によるものである場合もあります。患者2においては、微生物が抗生物質耐性または病原性遺伝子を環境中のドナーから積極的に獲得しています。この過程では、薬剤耐性または病原性に迅速な変化が生じる可能性があります。

参考文献

Robinson, T., Campino S. G., Auburn S., Assefa S. A., Polley S. D., et al. (2011) Drug-resistant genotypes and multi-clonality in *Plasmodium falciparum* analysed by direct genome sequencing from peripheral blood of malaria patients. *PLoS ONE* 6: e23204²¹

著者らは、臨床マラリアに対する治療を受けている4人の異なる患者から直接取得した、培養を行っていない5種類の熱帯熱マラリア原虫の寄生虫分離株のシーケンスを行いました。シーケンスを行った分離株には、既知および新規の遺伝子欠失および増幅が含まれていました。クローンの多様性に関する全ゲノム解析により、各患者が少なくとも3種類の熱帯熱マラリア原虫のクローンを保有していることが明らかとなりました。このことから、マラリア患者から直接取得した末梢血熱帯熱マラリア原虫のゲノムシーケンスから得られる高品質のデータは、薬物耐性研究、ゲノム構造解析および集団遺伝学において有用であり、しかもクローンの多様性を確実に示すものであることが示されました。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}によって得られる、200～300bpのDNA断片からの54bpまたは76bpペアエンドシーケンスリード解析

Avasthi, T. S., Devi S. H., Taylor T. D., Kumar N., Baddam R., et al. (2011) Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. *J Bacteriol* 193: 3385-3386

著者らは、2種類の連続培養分離株であるピロリ菌2017およびピロリ菌2018のゲノムシーケンスを報告しています。このゲノムシーケンスにより、病原性の至適化または宿主特異的適応に関連するゲノム変化が明らかとなっています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Manske, M., Miotto O., Campino S., Auburn S., Almagro-Garcia J., et al. (2012) Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature* 487: 375-379

²¹ Robinson, T., Campino, S. G., Auburn, S., Assefa, S. A., Polley, S. D., et al. (2011) Drug-resistant genotypes and multi-clonality in *Plasmodium falciparum* analysed by direct genome sequencing from peripheral blood of malaria patients. *PLoS ONE* 6: e23204

抗生物質耐性および病原性

抗生物質耐性は細菌群における進化ストレスが引き起こす深刻な影響です。病原性のマーカーとしては、血清型が一般的に使用されています。しかし、血清型を決定するために細菌莢膜をコードする遺伝子と抗生物質耐性に関連する遺伝子との間には殆どあるいは全く機能的な関連性はありません。細菌は、その病原性および抗生物質耐性を保持したまま莢膜を変化させることも可能です²²。次世代シーケンサーは抗生物質耐性および病原性の進化を追跡するための強力なツールであることが示されています。



4種類の異なる抗生物質を含む紙ディスクが、シャーレ中の黄色ブドウ球菌の薄膜上に設置されています。ディスク周辺の、細菌が存在しない反応領域の生成により抗生物質の効果が可視化されます。

参考文献

Harris, S. R., Clarke I. N., Seth-Smith H. M., Solomon A. W., Cutcliffe L. T., et al. (2012) Wholegenome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44: 413-419, S411

この文献では、トラコーマおよび鼠径リンパ肉芽腫 (LGV) 由来の *C. trachomatis* 次亜種の代表株の全ゲノムシーケンスに基づいた、系統発生論の詳細について紹介しています。クラジミア属の分離のために従来から使用されている *ompA* を用いて系統発生論的構造を予測する方法は、この領域の広範な遺伝子組換えが真の関係を隠蔽してしまうために、誤解を招く恐れがあるとこの報告では指摘しています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{II}

Chua, K. Y., Seemann T., Harrison P. F., Monagle S., Korman T. M., et al. (2011) The dominant Australian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST93-IV [2B] is highly virulent and genetically distinct. *PLoS ONE* 6: e25887

地理的および遺伝的に多様な CA-MRSA ゲノム間の比較から、CA-MRSA の明らかな収束進化は、高度に保存されたアクセサリゲノムの共通源からの迅速な伝播により説明することができる可能性があることが示唆されます。これは臨床的および疫学的プロファイルがいかに誤解を招くものであり得るかということ、そして伝染病を追跡する場合には細菌の全ゲノムシーケンスがいかに重要であるかを示す良い一例です。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IX} による 36bp ペアエンドリード解析

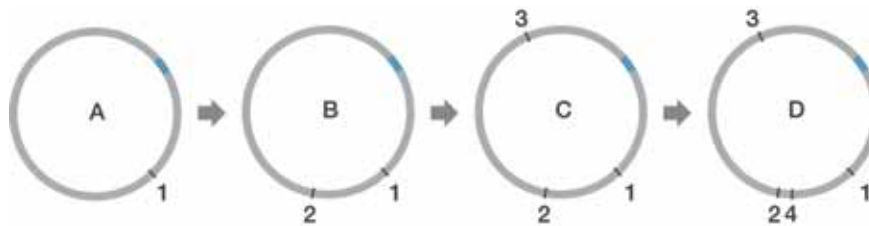
Gonzalez-Escalona, N., Strain E. A., De Jesus A. J., Jones J. L. and Depaola A. (2011) Genome sequence of the clinical O4:K12 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strain 10329. *J Bacteriol* 193: 3405-3406

Izumiya, H., Sekizuka T., Nakaya H., Taguchi M., Oguchi A., et al. (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623-630

²² Pillai, D. R., Shahinas, D., Buzina, A., Pollock, R. A., Lau, R., et al. (2009) Genome-wide dissection of globally emergent multidrug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 10: 642

伝染病および感染

伝染病および微生物感染は従来、微生物ゲノムのごく一部の任意な部分をモニターする血清学的マーカーあるいはその他のマーカーにより追跡されてきました。微生物ゲノムのモザイク性のため、ゲノム的一部分のみをモニターする方法はいずれも比較的信頼度が低く、低感度となります。これとは対照的に、次世代シーケンサーはゲノム中のすべての塩基を追跡することが可能で、伝染病および微生物感染の追跡過程の概念に革命をもたらされています^{23,24}。今や感染は家族内²⁵または病院内²⁶においても比較的短期間に追跡することができ、発生源の確定が可能となっています^{27,28,29}。このため、伝染病および微生物感染の発生に対してより迅速でターゲットを絞った対策を講じることが可能となりました³⁰。次世代シーケンサーにはさらに、発生期間中に蓄積する変異により、発現する可能性のある抗生物質耐性および病原性の変化に関する情報を得ることができるという利点もあります^{31,32}。



微生物が変異を蓄積していくに伴い、形質転換の過程を追跡することが可能です。

ここでは、仮想症例における変異の蓄積を数字で示しています。

例えば数週間単位の短期間の形質転換を追跡するためには、シーケンス技術によりゲノムのあらゆる位置において単一塩基変異を確実に検出できることが必要となります。

レビュー

Lenski, R. E. (2011) Chance and necessity in the evolution of a bacterial pathogen. *Nat Genet* 43: 1174-1176

Editorial, N. B. (2011) Outbreak genomics. *Nat Biotechnol* 29: 769

²³ Croucher, N. J. (2009) From small reads do mighty genomes grow. *Nat Rev Microbiol* 7: 621

²⁴ He, M., Sebaihia, M., Lawley, T. D., Stabler, R. A., Dawson, L. F., et al. (2010) Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7527-7532

²⁵ Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

²⁶ Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327: 469-474

²⁷ Hendriksen, R. S., Price, L. B., Schupp, J. M., Gillece, J. D., Kaas, R. S., et al. (2011) Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *MBio* 2: e00157-00111

²⁸ Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465

²⁹ Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070

³⁰ Eyre, D. W., Golubchik, T., Gordon, N. C., Bowden, R., Piazza, P., et al. (2012) A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open* 2:

³¹ Howden, B. P., McEvoy, C. R., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., et al. (2011) Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359

³² Tse, H., Bao, J. Y., Davies, M. R., Maamary, P., Tsoi, H. W., et al. (2012) Molecular characterization of the 2011 Hong Kong scarlet fever outbreak. *J Infect Dis* 206: 341-351

参考文献

Eyre, D. W., Golubchik T., Gordon N. C., Bowden R., Piazza P., et al. (2012) A pilot study of rapid benchtop sequencing of Staphylococcus aureus and Clostridium difficile for outbreak detection and surveillance. BMJ Open 2:

著者らは、26種類のMRSAおよび15種類のC. difficileの培養5日以内の分離株のシーケンスおよび解析に成功しています。いずれのMRSAクラスターも集団発生として同定され、各クラスターのシーケンスの大部分は区別が不可能で、すべては3つ以内の一塩基変異(SNV)でした。同じspa型で疫学的に関連のない分離株は遺伝的に異なっていました(21以上のSNV)。C. difficileクラスターではいずれも、疫学的に関連のある症例(1症例では同一株タイプを共有)は、遺伝的に異なっていることが示されました(144以上のSNV)。C. difficileクラスター観察においては、迅速なシーケンスを利用した再構築により発生が早期に検出され、以前には検出されなかった恐らく地域感染であろうと考えられる感染が検出されました。この研究によって、微生物の種類にかかわらず同一の技術と方法が使用できるという有用な知見が得られています。

イルミナ技術：Miseqによる150bpペアエンドリード解析

McAdam, P. R., Templeton K. E., Edwards G. F., Holden M. T., Feil E. J., et al. (2012) Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 9107-9112

系統地理学的な解析により、英国内においてEMRSA-16が、ロンドンおよびグラスゴーの大都市の病院から地方の医療施設へ伝染したことが示されており、患者の照会が国内伝染の重要な原因の一つであることが示唆されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Gardy, J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. N Engl J Med 364: 730-739

2006年ブリティッシュコロンビア州における結核菌の集団発生は、複雑な流行病の発生をシーケンスによって解明することが可能であることを示す例です。マイコバクテリア分散型繰り返しユニット反復配列多型(MIRU-VNTR)遺伝子型解析および従来の接触者追跡調査の結果により結核菌の流行起源が同定されなかったため、著者らは流行の動態をより高い分解能で解析するために、全ゲノムシーケンスおよびソーシャルネットワーク解析を使用しました。この解析のために著者らは合計36の結核菌株(37の集団発生分子株のうちの32の株、および同一のMIRU-VNTRパターンを有する過去の4種類の分離株)のシーケンスを行いました。このシーケンスにより、少なくとも1つの50bpリードにより、平均99.21%のレファレンスゲノムがカバーされました。全ゲノムシーケンスにより得られるより高い分解能のSNPパターンにより、この集団発生がそれぞれ異なる結核菌株を原因菌とする2つの集団発生の癒合であることが明らかとされました。2種類の現存する株が同時に再出現していることから、生物における遺伝的変化ではなく社会的または環境的因子が集団発生の引き金となった可能性が示唆されます。流行病の集団発生時にピークに達していた、地域内におけるクラックコカインの使用がこの集団発生の引き金となった可能性があります。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

³³ Johnson, J. R., Clabots, C. and Kuskowski, M. A. (2008) Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of Escherichia coli clones from human and animal household members. J Clin Microbiol 46: 4078-4082

Reeves, P. R., Liu B., Zhou Z., Li D., Guo D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an Escherichia coli clone over 3 years. PLoS ONE 6: e26907

著者らは、イヌを含めた一家族内に3年間存在し続けていた尿路病原性大腸菌クローンの14の分離株のゲノムシーケンスを報告しています。宿主データからは、3年の間に少なくとも6回の宿主伝播イベントが発生し、その期間を通して2つの系統が存在していたことが示唆されています。従来の型による分類技術を使用した研究では伝播を解明することは不可能でした³³。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}



Reevesら³⁴は、イヌを含めた一家族内に3年間存在し続けていた尿路病原性大腸菌クローンの感染を報告しています。このデータからは、少なくとも6宿主への伝播のイベントの存在が示唆されています。

Hendriksen, R. S., Price L. B., Schupp J. M., Gillece J. D., Kaas R. S., et al. (2011) Population genetics of Vibrio cholerae from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. MBio 2: e00157-00111

ハイチおよびネパールからのコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) の分離株の全ゲノムの比較により、ネパールからの24のコレラ菌分離株が、バングラデシュおよびハイチからの分離株も含めた、1つの単系統性集団に属することが示されました。1つのクラスターには3つのネパール分離株と3つのハイチ分離株が含まれ、これらの株には1bpまたは2bpの相違が存在するのみで、お互いにほぼ同一でした。この研究結果は、ネパールがハイチにおける集団発生の起源であるという事実を裏付けています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IX} によるマルチプレックス76bpペアエンドリード解析

Casali, N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Ignatyeva O., Kontsevaya I., et al. (2012) Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 22: 735-745

Omer, H., Rose G., Jolley K. A., Frapy E., Zahar J. R., et al. (2011) Genotypic and phenotypic modifications of *Neisseria meningitidis* after an accidental human passage. *PLoS ONE* 6: e17145

Fittipaldi, N., Beres S. B., Olsen R. J., Kapur V., Shea P. R., et al. (2012) Full-genome dissection of an epidemic of severe invasive disease caused by a hypervirulent, recently emerged clone of group A *Streptococcus*. *Am J Pathol* 180: 1522-1534

Grad, Y. H., Lipsitch M., Feldgarden M., Arachchi H. M., Cerqueira G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070

Tse, H., Bao J. Y., Davies M. R., Maamary P., Tsoi H. W., et al. (2012) Molecular characterization of the 2011 Hong Kong scarlet fever outbreak. *J Infect Dis* 206: 341-351

Mutreja, A., Kim D. W., Thomson N. R., Connor T. R., Lee J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465

Gardy, J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730-739

³⁴ Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

参考文献

- Auburn, S., Campino, S., Clark, T. G., Djimde, A. A., Zongo, I., et al. (2011) An effective method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 6: e22213
- Avasthi, T. S., Devi, S. H., Taylor, T. D., Kumar, N., Baddam, R., et al. (2011) Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. *J Bacteriol* 193: 3385-3386
- Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., et al. (2012) Micro-evolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 22: 735-745
- Cejkova, D., Zbanikova, M., Chen, L., Pospisilova, P., Strouhal, M., et al. (2012) Whole genome sequences of three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1471
- Chua, K. Y., Seemann, T., Harrison, P. F., Monagle, S., Korman, T. M., et al. (2011) The dominant Australian community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST93-IV [2B] is highly virulent and genetically distinct. *PLoS ONE* 6: e25887
- Colvin, J. M., Jaffe, D. M. and Muenzer, J. T. (2012) Evaluation of the precision of emergency department diagnoses in young children with fever. *Clin Pediatr (Phila)* 51: 51-57
- Conway, C., Chalkley, R., High, A., MacLennan, K., Berri, S., et al. (2012) Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. *J Mol Diagn* 14: 104-111
- Croucher, N. J. (2009) From small reads do mighty genomes grow. *Nat Rev Microbiol* 7: 621
- Croucher, N. J., Harris, S. R., Barquist, L., Parkhill, J. and Bentley, S. D. (2012) A high-resolution view of genomewide pneumococcal transformation. *PLoS Pathog* 8: e1002745
- Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. and Crook, D. W. (2012) Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 13: 601-612
- Editorial, N. B. (2011) Outbreak genomics. *Nat Biotechnol* 29: 769
- Engelthaler, D. M., Bowers, J., Schupp, J. A., Pearson, T., Ginther, J., et al. (2011) Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern AZ, USA. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1347
- Eyre, D. W., Golubchik, T., Gordon, N. C., Bowden, R., Piazza, P., et al. (2012) A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open* 2: Fittipaldi, N., Beres, S. B., Olsen, R. J., Kapur, V., Shea, P. R., et al. (2012) Full-genome dissection of an epidemic of severe invasive disease caused by a hypervirulent, recently emerged clone of group A *Streptococcus*. *Am J Pathol* 180: 1522-1534
- Flaherty, P., Natsoulis, G., Muralidharan, O., Winters, M., Buenrostro, J., et al. (2012) Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e2
- Gao, W., Chua, K., Davies, J. K., Newton, H. J., Seemann, T., et al. (2010) Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog* 6: e1000944
- Gardy, J. L., Johnston, J. C., Ho Sui, S. J., Cook, V. J., Shah, L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730-739
- Gonzalez-Escalona, N., Strain, E. A., De Jesus, A. J., Jones, J. L. and Depaola, A. (2011) Genome sequence of the clinical O4:K12 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strain 10329. *J Bacteriol* 193: 3405-3406
- Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070
- Griffith, F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27: 113-159
- Gysin, C., Althman, G. A. and Papsin, B. C. (2000) Sinonasal disease in cystic fibrosis: clinical characteristics, diagnosis, and management. *Pediatr Pulmonol* 30: 481-489
- Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327: 469-474
- Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., et al. (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44: 413-419, S411
- He, M., Sebahia, M., Lawley, T. D., Stabler, R. A., Dawson, L. F., et al. (2010) Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7527-7532
- Hendriksen, R. S., Price, L. B., Schupp, J. M., Gillece, J. D., Kaas, R. S., et al. (2011) Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *MBio* 2: e00157-00111
- Howden, B. P., McEvoy, C. R., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., et al. (2011) Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359
- Izumiya, H., Sekizuka, T., Nakaya, H., Taguchi, M., Oguchi, A., et al. (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623-630
- Jiang, Z., Jhunjunwala, S., Liu, J., Haverty, P. M., Kennemer, M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res* 22: 593-601
- Johnsborg, O., Eldholm, V. and Havarstein, L. S. (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* 158: 767-778

- Johnson, J. R., Clabots, C. and Kuskowski, M. A. (2008) Multiple-host sharing, longterm persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J Clin Microbiol* 46: 4078-4082
- Koser, C. U., Niemann, S., Summers, D. K. and Archer, J. A. (2012) Overview of errors in the reference sequence and annotation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and variation amongst its isolates. *Infect Genet Evol* 12: 807-810
- Kriesel, J. D., Hobbs, M. R., Jones, B. B., Milash, B., Nagra, R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. *PLoS ONE* 7: e31886
- Lenski, R. E. (2011) Chance and necessity in the evolution of a bacterial pathogen. *Nat Genet* 43: 1174-1176
- Lever, M., Zamfir, O., Clermont, O., Bouvet, O., Lespinats, S., et al. (2010) Molecular and evolutionary bases of within-patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog* 6: e1001125
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., et al. (2012) Highthroughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* 10: 599-606
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30: 434-439
- Manske, M., Miotto, O., Campino, S., Auburn, S., Almagro-Garcia, J., et al. (2012) Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature* 487: 375-379
- McAdam, P. R., Holmes, A., Templeton, K. E. and Fitzgerald, J. R. (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* 6: e24301
- McAdam, P. R., Templeton, K. E., Edwards, G. F., Holden, M. T., Feil, E. J., et al. (2012) Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9107- 9112
- Moore, R. A., Warren, R. L., Freeman, J. D., Gustavsen, J. A., Chenard, C., et al. (2011) The sensitivity of massively parallel sequencing for detecting candidate infectious agents associated with human tissue. *PLoS ONE* 6: e19838
- Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465
- Nishijima, N., Marusawa, H., Ueda, Y., Takahashi, K., Nasu, A., et al. (2012) Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE* 7: e35052
- Omer, H., Rose, G., Jolley, K. A., Frapy, E., Zahar, J. R., et al. (2011) Genotypic and phenotypic modifications of *Neisseria meningitidis* after an accidental human passage. *PLoS ONE* 6: e17145
- Pillai, D. R., Shahinas, D., Buzina, A., Pollock, R. A., Lau, R., et al. (2009) Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* 10: 642
- Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907
- Robinson, T., Campino, S. G., Auburn, S., Assefa, S. A., Polley, S. D., et al. (2011) Drug-resistant genotypes and multiclonality in *Plasmodium falciparum* analysed by direct genome sequencing from peripheral blood of malaria patients. *PLoS ONE* 6: e23204
- Sibley, C. D., Peirano, G. and Church, D. L. (2012) Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 12: 505-521
- Tapparel, C., Cordey, S., Junier, T., Farinelli, L., Van Belle, S., et al. (2011) Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. *PLoS ONE* 6: e21163
- Tse, H., Bao, J. Y., Davies, M. R., Maamary, P., Tsoi, H. W., et al. (2012) Molecular characterization of the 2011 Hong Kong scarlet fever outbreak. *J Infect Dis* 206: 341- 351
- Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Sodergren, E., Weinstock, G. M. and Storch, G. A. (2012) Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS ONE* 7: e27735
- Yongfeng, H., Fan, Y., Jie, D., Jian, Y., Ting, Z., et al. (2011) Direct pathogen detection from swab samples using a new highthroughput sequencing technology. *Clin Microbiol Infect* 17: 241-244
- Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M. D., Balmaseda, A., Harris, E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1485

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

www.illumina.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illuminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc. の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 773-2012-J056 08MAR2013

illumina[®]