

不明病原体に対する次世代シーケンス技術利用の基本指針（案）

（第3版）

初版：令和6年12月

第2版：令和7年7月

第3版：令和8年4月

目次

1. 背景と目的
2. 適応
3. 品質管理
4. 限界
5. 倫理規定

【参考文献】

主な改訂履歴

1. 背景と目的

次世代シーケンス（NGS, Next-generation sequencing）技術は、臨床および公衆衛生分野での感染症診断や病原体特定において、従来の検査法で得られる情報に加え、新たな視点や情報を提供する可能性がある。特に感染症診断が困難なケース、不明病原体や新興感染症の発見において有効性が示されており、臨床現場や公衆衛生での応用が進められている。

現在、NGS 技術を不明病原体にどのように利用するか国際的基準・方針はない。また、NGS 技術の利用には、検査手技、バイオインフォマティクスなど専門的な知識と技術が求められる。特に臨床検体に対する病原体検査に用いられる Clinical metagenomic NGS は、その解釈に複数の分野にまたがる専門家の協力が必要であり、本基本指針はその協力を促進し、統一的なガイドラインを策定することを目的としている。

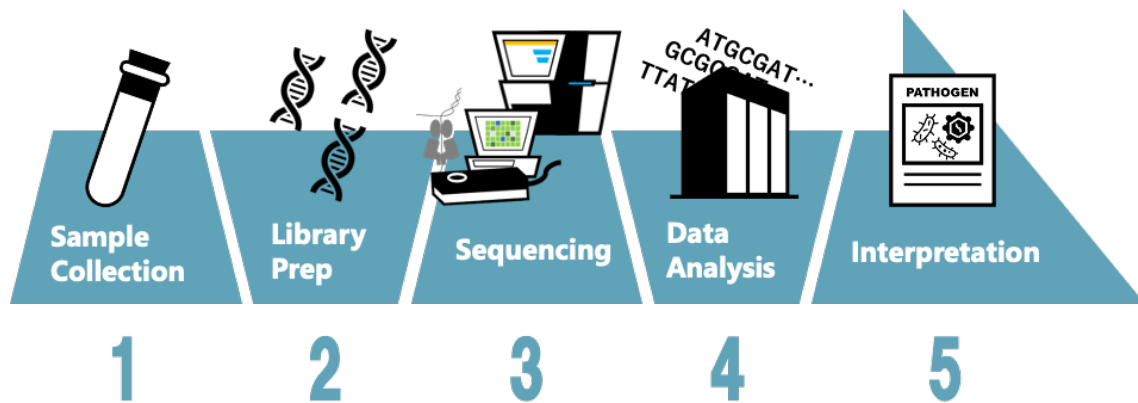


図 1. Clinical metagenomic NGS の 5 つのプロセス

2. 適応

(2-1) NGS 技術の適応

metagenomic NGS (mNGS) が適応となる場合は下記とする。

感染症を疑う症例*で

- (1) 適切な微生物検査を行ったが原因が不明な場合
- (2) 適切な微生物検査がない病原体が疑われる場合
- (3) 採取された検体量が限られている場合
- (4) 病原体ゲノム情報が診断に有用である場合

* 感染症を専門とする医療チームによる鑑別診断のプロセスを経た上で、NGS 解析の実施を検討することが望ましい。十分な臨床推論は、解析結果の解釈を支援し、患者のアウトカム改善にも寄与する。また、multiplex PCR 等を含む従来検査法による十分な除外診断を行うことが推奨される (図 2)。

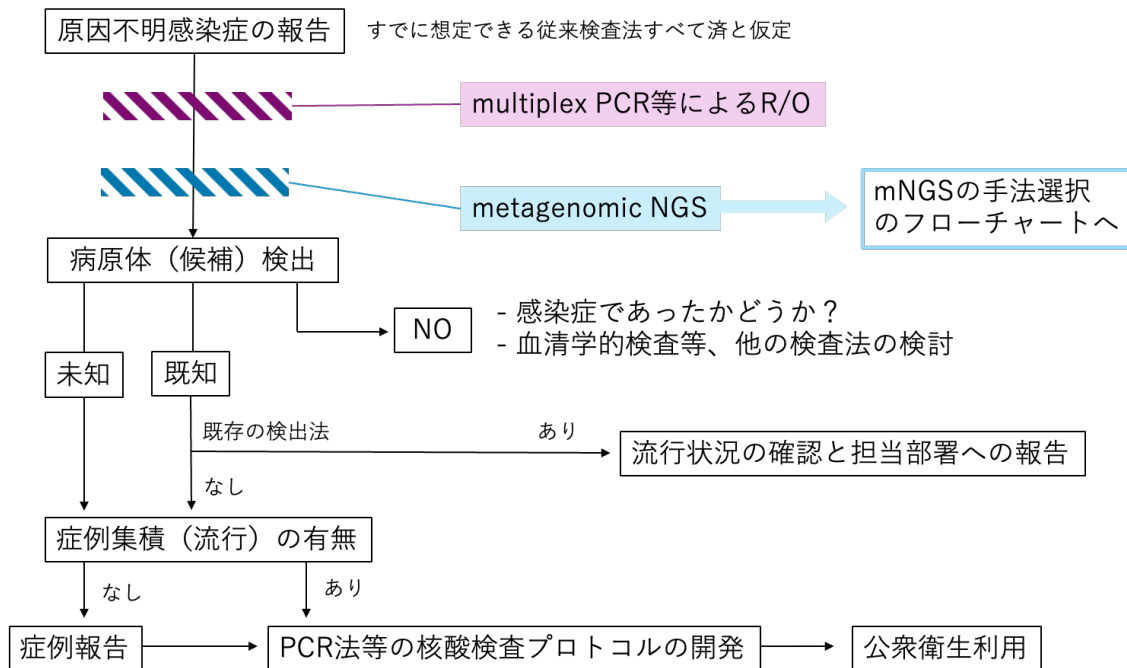


図 2. Clinical metagenomic NGS 使用までのワークフロー

(2-2) 対象とする検体種

mNGS に用いる検体種は下記とする。

(1) 感染臓器が想定される場合：

血液、感染臓器に関連する検体種

(2) 感染臓器が想定されない場合：

血液、尿、便、髄液、咽頭拭いスワブの 5 種類

(あれば、侵入門戸と疑われる部位の検体も追加を考慮する)

注 1：検体量は手法により異なる。

注 2：臓器別感染症における適切な検体種のエビデンスはない。

(2-3) NGS 手法の選択

mNGS として利用される代表的な NGS 手法には、以下の 3 つが挙げられる。

(1) アンプリコンシーケンス (Amplicon Sequencing)

(2) ショットガンシーケンス (Shotgun Sequencing)

(3) キャプチャー (ターゲット) シーケンス (Captured [Targeted] Sequencing)

これらの手法はそれぞれ特徴が異なるため、感染症患者の臨床情報から疑われる病原体、採取された検体の種類・量・状態、さらに抽出された核酸量を踏まえて、適切な手法を選択する (図 3)。各手法における推奨プロトコルについては、別紙を参照されたい。

また、適切な手法が選択できない場合にあっては、代替手法として他の手法を用いて良い。その場合、各手法で検出可能な病原体の限界について理解した上での使用が望まれる。例えば、16S rRNA 領域をターゲットとするアンプリコンシーケンスでは、選択する領域 (可変領域) によって得られる分類学的解像度が異なり、この手法ではウイルスを理論上検出することはできない。また、キャプチャーシーケンスでは、設計されたプローブが標的とする微生物およびその類縁種以外は、理論上検出することができない。

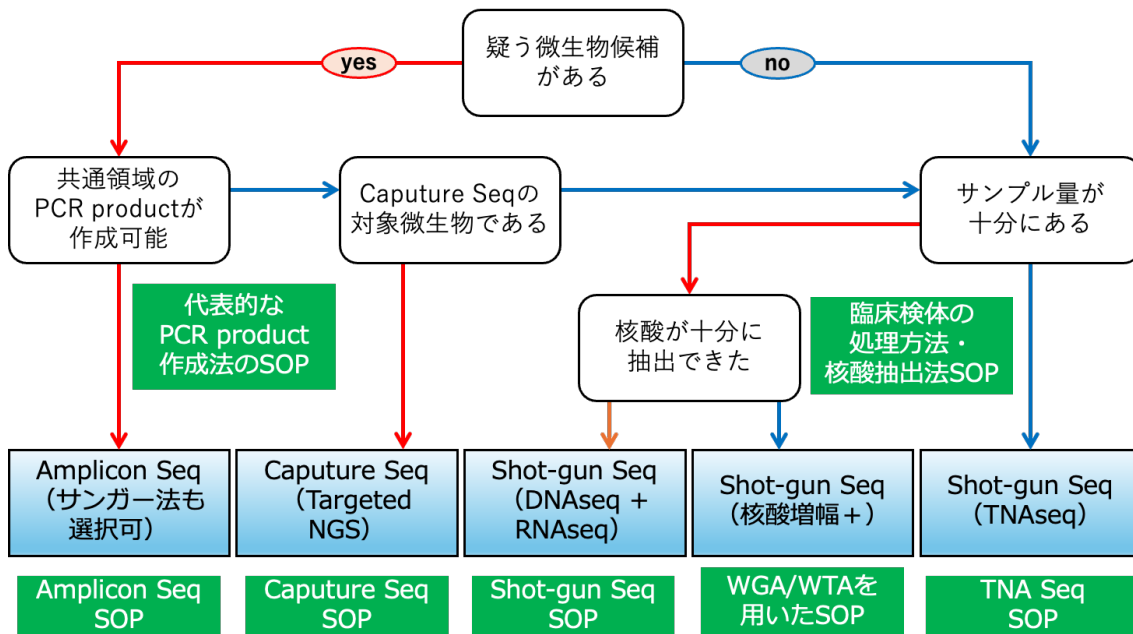


図 3. Clinical metagenomic NGS の手法選択のフローチャート

3. 品質管理

(3-1) コンタミネーション

mNGS 解析ではコンタミネーションの管理が最も重要である。コンタミネーションは偽陽性の原因であり、特に原因不明症例となりやすい免疫不全状態の患者検体の場合に結果解釈を困難にする。よって、結果の解釈時には検体採取者、検査施行者からの情報提供が必要である。

■ 注意すべきコンタミネーション

(1) 検体採取時：

検体採取者/患者の皮膚常在微生物、採取に用いた器具や採血管等に付着する環境微生物、検体保管場所の環境微生物

(2) 検体処理時：

検査施行者の皮膚常在菌微生物、検査室の環境微生物、検査室で通常取り扱っている微生物や微生物由来の核酸・PCR 産物による実験器具・機器の汚染、kit-ome（試薬に含まれる微生物由来の核酸）、splash-ome（作業時に発生する飛沫に含まれる核酸）

(3) シークエンス時：

シークエンス機器経路中の過去サンプルの混入、Index hopping（複数ライブラリーをプールした際に index の組み換えが起こり、別のライブラリー由来のシークエンス結果が含まれてしまう現象）

■ コンタミネーションの管理方法

- (1) 検体採取は培養検査法と同じ配慮・手技で行う。
- (2) 検査環境で、他の微生物由来核酸（特に PCR 産物）を取り扱わない。
- (3) プロトコル、使用する試薬、シークエンスランの管理を徹底する。
- (4) 陰性コントロールを設定する。

注：シークエンス解析を外部委託する場合は、シークエンスランを依頼者側で管理することが難しいため注意が必要である。

(3-2) データ解析上の偽陽性

mNGS 解析で得られた塩基配列情報の処理の上で偽陽性が生じる場合がある。主に下記が要因であり解釈時に注意を要する。よって、結果の解釈時には、データ解析者による情報提供や検証作業が必要である。

- (1) シークエンスデータの misalignment
- (2) 非特異的配列の検出による偽陽性
- (3) 不完全なデータベース由来の偽陽性

注：使用したソフトウェアの種類やバージョン、データベースの対象とする範囲や規模によって、同じシークエンス結果から異なる解析結果が導かれる場合がある。実験記録と同様に、データ解析手順も再現可能である十分な記録が必要である。

(参考) データ解析上、記録すべき内容：

- 計算資源の環境 (OS やそのバージョン)
- ソフトウェアやパイプラインとバージョン、文献情報
- データベース (データ更新日)、文献情報

4. 限界

mNGS 解析は検体中に存在する核酸を網羅的に塩基配列決定できるため、新たな微生物検査法として期待されているが、万能ではない。微生物検査法としての能力と限界の理解が必要である。

(1) NGS 解析は核酸検出法である

核酸検出法であり、核酸の存在を根拠に微生物の有無を判断する。一般に感染の有無の判断に用いることはできない。微生物の生死は問えない。PCR 検査法と同じく、結果の解釈に臨床的な妥当性の判断が必要である。

(2) 結果がデータベースに依存する

得られた塩基配列情報をデータベースに照合して結果を得る。データベースに登録のない微生物は結果に反映されない（ただし、類縁の微生物として検出することが可能である）。適切なデータベースを使用する必要がある。

(3) 検査基準が確定していない

国際的なコンセンサスを得た検査プロトコル、データ解析プロトコル、検出基準、解釈基準が策定されていない。現時点では研究段階の検査法である。

本指針は本邦における mNGS 検査基準を策定するための基盤構築を目的に提案された。

5. 倫理規定

日本においては、倫理指針によって、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する規制がなされており、対象となる研究を実施する場合には、倫理審査委員会での審査を要する。

診断検査目的での mNGS 解析は倫理審査を必要としないが、研究目的での mNGS 解析を、臨床検体を用いて実施する場合は、現行の「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（令和 5 年 3 月 27 日一部改正）の対象に該当し、倫理審査を必要とする。人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針ガイダンス（令和 6 年 4 月 1 日）において、人体から分離した細菌、カビ等の微生物及びウイルスの分析等を行うのみで、人の健康に関する事象を研究の対象としない場合は、「人を対象とする」研究に該当しないものと判断してよいとされているが、臨床検体を用いる場合はヒトを対象とする研究に該当すると考えられる。また、患者から分離した病原微生物等の分析・調査から得られた情報を用いて、他の診療情報を組み合わせて、感染症の成因や病態の理解等を通じて国民の健康の保持増進又は患者の感染症からの回復等に資する知識を得ることを目的として実施される場合も、「人を対象とする」研究に該当することとされている。

研究目的で mNGS 解析を実施する場合に、必要となるインフォームドコンセント（IC）の要件や手続きは、検体が取得された経緯や、個人情報の取扱いの有無等によって異なる。試料が特定の個人を識別できない状態にあり、試料の利用により個人情報を取得することがなく、研究に用いられる情報が匿名加工情報、既存の仮名加工情報または個人関連情報である場合、IC 手続きは不要と考えられる。この際の「個人情報」「匿名加工情報」「仮名加工情報」「個人関連情報」の定義は個人情報保護法により規定されている。平成 29 年 5 月、改正個人情報保護法施行令が施行され、個人情報の一つとして個人識別符号という概念が定められ、個人識別符号の一つとして、「細胞から採取されたデオキシリボ核酸（別名 DNA）を構成する塩基の配列」を電子計算機の用に供するために変換した文字、番号、記号その他の符号であって、特定の個人を識別するに足りるものとして個人情報保護委員会規則で定める基準に適合するもの」が定義された。また、個人情報保護法ガイドライン（通則編）において、上記の具体的な定義として「ゲノムデータ（細胞から採取されたデオキシリボ

核酸（別名 DNA）を構成する塩基の配列を文字列で表記したもの）のうち、全核ゲノムシーケンスデータ、全エクソームシーケンスデータ、全ゲノム一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）データ、互いに独立な 40 箇所以上の SNP から構成されるシーケンスデータ、9 座位以上の 4 塩基単位の繰り返し配列（short tandem repeat：STR）等の遺伝型情報により本人を認証することができるようにしたもの」とされた。mNGS 解析は検体中に存在する核酸を網羅的に塩基配列決定できるが、感染症の原因となる微生物を検出することを目的とする。mNGS 解析のうち、微生物ゲノムの特定領域を対象とするアンプリコンシーケンスは、ヒトゲノムを対象とせず微生物のゲノム配列のみをターゲットとしてゲノム解析を行う解析法である。この場合は、ヒトゲノム由来の塩基を読むことはほぼなく、解析によって個人識別符号を取得することはないと明言できるだろう。ショットガンシーケンスやキャプチャーシーケンスの場合、解析の過程でヒトゲノム由来の塩基配列を解読することが想定される。ただし、ヒトゲノムの塩基配列を決定するには、読み取った塩基配列の結果から、もとのゲノム DNA の塩基配列を再構成する必要があり、一定のシーケンス出力が必要であると考えられる。感染症診断目的で行われた mNGS 解析で得られた断片化されたヒトゲノム情報は、原則として単独では個人識別符号に該当しないと考えられる。将来的な解析技術やデータ統合の進展によりその評価が変わる可能性があることは留意すべきであるが、実施されたシーケンス出力から、個人識別符号に該当するヒトゲノムの塩基配列決定が可能となるだけのシーケンス出力が得られていないと想定される場合は、個人識別符号を意図せず取得するリスクは限りなく低いと考えられ、IC 取得不要と判断できる場合があるだろう。個々の研究における解析の実施方法等をふまえて、IC 等の要件を倫理審査委員会で判断する必要がある。

従って、研究計画書を作成する際は、利用する対象者の試料・情報を明確にした上で、それぞれのゲノム解析手法の記載と、解析により個人識別符号に該当する情報や、個人関連情報等を取得するのか否かを記載することが肝要となる。

【参考文献】

1. Chiu, C.Y., Miller, S.A. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet* 20, 341–355 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>
2. Gwinn M, MacCannell D, Armstrong GL. Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens. *JAMA*. 2019 Mar 5;321(9):893-894. doi: 10.1001/jama.2018.21669.
3. Gu W, Deng X, Lee M, Sucu YD, Arevalo S, Stryke D, Federman S, Gopez A, Reyes K, Zorn K, Sample H, Yu G, Ishpuniani G, Briggs B, Chow ED, Berger A, Wilson MR, Wang C, Hsu E, Miller S, DeRisi JL, Chiu CY. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. *Nat Med*. 2021 Jan;27(1):115-124. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z.
4. Horiba K, Torii Y, Okumura T, Takeuchi S, Suzuki T, Kawada JI, Muramatsu H, Takahashi Y, Ogi T, Ito Y. Next-Generation Sequencing to Detect Pathogens in Pediatric Febrile Neutropenia: A Single-Center Retrospective Study of 112 Cases. *Open Forum Infect Dis*. 2021 May 4;8(11):ofab223. doi: 10.1093/ofid/ofab223.
5. Valencia-Shelton F, Anderson N, Palavecino EL, Navas ME, Larkin PMK, She R, Filkins LM. Approaches to developing and implementing a molecular diagnostics stewardship program for infectious diseases: an ASM Laboratory Practices Subcommittee report. *J Clin Microbiol*. 2024 Nov 13;62(11):e0094124. doi: 10.1128/jcm.00941-24.
6. 堀場千尋. 次世代シーケンスによる感染症診断を通じてみる「臨床と WET と DRY の連携」. *臨床とウイルス* 52 (5) 297-301, 2024.
7. 文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省. 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (本文) (令和 5 年 3 月 27 日一部改正) . <https://www.mhlw.go.jp/content/001077424.pdf>
8. 厚生労働省. 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針ガイダンス (令和 6 年 4 月 1 日) . <https://www.mhlw.go.jp/content/001237478.pdf>
9. 個人情報保護委員会. 個人情報保護法ガイドライン (通則編) . https://www.ppc.go.jp/files/pdf/260401_guidelines01.pdf

【執筆者】

文責：

堀場 千尋（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

協力者（五十音順）：

阿戸 学（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

木原 朋未（国立感染症研究所 研究企画調整センター）

橋野 正紀（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

船木 孝則（国立感染症研究所 研究企画調整センター）

主な改訂履歴

| 改訂版 | 改訂項目 | 改訂内容 |
|------------|------------------------------|--|
| 初版（R6年12月） | 指針（案）作成 | 新規作成 |
| 第2版（R7年7月） | 2. 適応 5. 倫理規定 参考文献 | 「（2-1）NGS技術の適応」の項に図2を追加 「（2-3）NGS手法の選択」の項を追加 新規作成 文献の追加 |
| 第3版（R8年4月） | 5. 倫理規定 参考文献 | 研究目的における倫理規定について加筆 文献の追加 |