

「遺伝子解析情報に基づいた細菌の薬剤耐性に関わる領域の解析  
ならびに新しい変異検出法の検討」

三沢 和央

(呼吸器病学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度



第1章 緒言 .....	1 頁
第1節 薬剤耐性菌の現状 .....	1 頁
第2節 薬剤感受性検査について .....	3 頁
第3節 本研究の目的 .....	5 頁
* 1 NGS のデータ解析に関する用語の説明 .....	7 頁
第2章 $\beta$ ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) インフルエンザ菌の薬剤耐性 に関する一塩基多型 (SNP) の解析 .....	11 頁
第1節 背景 .....	11 頁
第2節 方法 .....	12 頁
第3節 結果 .....	15 頁
第4節 考察 .....	17 頁
第3章 ポータブルシーケンサーによる結核菌薬剤耐性の迅速診断 .....	20 頁
第1節 背景 .....	20 頁
第2節 方法 .....	23 頁
* 2 ナノポアシーケンサーMinION に関する説明 .....	28 頁
第3節 結果 .....	30 頁

第1項 ナショナルバイオリソース譲渡の検体を用いた実験系の確立 .....	33頁
* 3 BLAST フィルターについて .....	34頁
第2項 防衛医科大学校病院 微生物検査室の検体を用いた解析 .....	35頁
第3項 MinION で同定困難な変異部位の検証 .....	36頁
第4節 考察 .....	38頁
第4章 総括 .....	43頁
参考文献 .....	45頁
謝辞 .....	47頁
引用文献 .....	48頁
図表 .....	76頁

## 第1章 緒言

### 第1節 薬剤耐性菌の現状

近年、様々な抗菌薬に対する耐性を獲得した細菌が登場し、臨床現場において影響を与えている。最も代表的なメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*、MRSA) をはじめ、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci、VRE)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant enterobacteriaceae、CRE)、基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (extended spectrum  $\beta$ -lactamase、ESBL) 産生菌、 $\beta$  ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性型 ( $\beta$ -lactamase negative ampicillin resistant, BLNAR) インフルエンザ菌、マクロライド耐性マイコプラズマ、さらには多剤耐性を獲得した緑膿菌 (multiple drug resistance *Pseudomonas aeruginosa*、MDR-P) や結核 (multiple drug resistance tuberculosis、MDR-TB)、アシネトバクター (multiple drug resistance *Acinetobacter baumannii*、MDR-A) など多くの耐性菌が臨床現場で問題となっており、その医学的、社会的影響力の大きさから 2019 年現在、我が国の感染症法にも 7 つの薬剤耐性菌が規定されている。

薬剤耐性菌による感染病態は標準治療が奏功せずに重症化する恐れがある。代表的な耐性菌である MRSA は、日本の院内検出率の 6.9%、黄色ブドウ球菌のうち 47.7%を占め、菌血症による死亡率は 15-60%と高い(1)。薬剤耐性結核は我

が国では少ないものの、世界保健機構（World Health Organization, WHO）によると全世界では年間 56 万人近い患者に検出されており、その約半数の 23 万人が死亡していると報告されている（2）。BLNAR 型インフルエンザ菌は特に日本において経口第 3 世代セフェム系抗菌薬の多用と関連していると考えられており、市中感染症としても頻度が高い菌である（3, 4）。近年は  $\beta$ -lactamase 産生能と BLNAR 型変異を併せ持つ  $\beta$ -lactamase - positive amoxicillin / clavulanate resistant (BLPACR) 型も検出、報告がされており、多様な薬剤耐性菌の出現は適切な抗菌薬選択を困難としている（5, 6）。

これら耐性菌の多くは抗菌薬の不適切な使用に伴い出現すると考えられている。特に医療環境では抗菌薬への暴露が多いため耐性菌は出現しやすく、また水平感染により患者間や医療従事者を介して蔓延するおそれもある（7）。近年では畜産業や水産業におけるルールの無い抗菌薬の大量使用によって多種多様な薬剤耐性菌が生み出されていることが明らかにされ（8）、WHO が提唱した “One Health” の目的のひとつである薬剤耐性問題の解決へ向けて、わが国でも厚生労働省が主導し「薬剤耐性対策アクションプラン」が決定され、国家単位でも対策が練られている（9）。

耐性菌を出現させないためには、薬剤耐性菌の可能性を常に念頭に置いた適正な抗菌薬使用の徹底が重要である。しかし、適正な抗菌薬使用を徹底したとし

ても微生物の環境適応能力は不測の展開を見せる可能性もあり、それに対して薬剤耐性菌の迅速な検出と各種抗菌薬への薬剤感受性の判定、把握が同時にできることが望ましい。

## 第2節 薬剤感受性検査について

これまで、薬剤感受性検査は培養を利用した方法（ディスク法、濃度勾配ストリップ法、寒天平板培地希釈法など）が行われてきた。これらは生菌を用いるため最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration、MIC）等の表現型判定が可能である反面、培地・検査用薬剤や培養設備などの機材を必要とし、また一定の時間を要するため迅速性に欠け、安定した結果を出すために習熟した技能を要するなどの問題点がある(10-12)。

一方、培養によらず分子生物学的手法を用いて薬剤耐性を判定・予測する方法も行われている。分子生物学的にみた薬剤耐性の機序には、1．抗菌薬の分解に関わる機序の変化（例： $\beta$ ラクタマーゼの産生など）、2．薬剤の作用点に関わる変化（例：ペニシリン結合蛋白質の変異など）、3．薬剤の分布に関わる変化（例：薬剤排出ポンプや細胞膜透過性の変化など）などが判明している(13, 14)。これら変化の多くは細菌の染色体もしくはプラスミド内の遺伝子が起因となっているものが多い。このことから遺伝子情報を調べることで、薬剤耐性を判定・

予測することが可能となった(15-18)。さらに最新の研究では病原体全ゲノムより MIC を予測する研究も進歩し、コンピュータ解析を用いた *in silico* MIC prediction panel などの報告例があり (19)、薬剤耐性の表現型と遺伝子型との関連性は非常に注目されている。

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) などの塩基変異の同定方法には、従来から行われている制限酵素を用いた RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法をはじめ、様々な方法 (TaqMan PCR 法、SNaP shot 法、Invader 法、DNA チップ法など) がある (20, 21)。またペプチド核酸 (peptide nucleic acid, PNA) と PCR (polymerase chain reaction) や LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法を併用した方法も開発されている (22, 23)。しかし、これら解析技術のほとんどは事前に設計した既知の変異部位しか判定できないものが多く、また塩基配列情報そのものが得られないことにより SNP が正しく判定されないことが問題となりうる。

これらの問題点を解決するためには塩基配列を直接解読・決定するシーケンスが必要となる。従来、塩基配列の決定にはサンガー法が広く用いられているが、これは目的の塩基断片を鋳型として蛍光標識し反応させた産物をキャピラリー内において電気泳動することで配列を決定する方法である。適切なサンプル処理により高い精度で塩基配列を決定することが可能である反面、1 サンプ



ルチューブあたり一つの鋳型 DNA について最大でも約 1000 塩基対程度までしか決定できず、またサンプルチューブ内に含まれる複数の遺伝子断片の配列を同時に決定することが不可能であるなど制約も多いことから、迅速かつ網羅的な解析には不適當であった。

近年、より多くの遺伝子配列情報を一度に大量取得する手法として次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) が登場した。NGS は機種により解析機序は異なるものの、同時に数千万～数億の DNA 断片を並列して処理・解読することが可能である。また近年はナノスケールの孔を DNA 鎖が通過する際の電位差を利用する新しいメカニズムの USB 接続式の携帯型ナノポアシーケンサーも登場し、より身近に遺伝子情報を利用することができるようになった(図 1)(24)。

### 第 3 節 本研究の目的

今回私は、特に呼吸器感染症の原因となる 2 つの病原体に着目し、NGS などの新しいテクノロジーを活用することで、遺伝子情報の観点から薬剤耐性を網羅的に検証することを研究目的とした。具体的には、まず①BLNAR 型インフルエンザ菌における  $\beta$  ラクタム系抗菌薬への薬剤耐性を、遺伝子型と表現型を直接比較することによって、潜在的な薬剤耐性遺伝子変異の広がりやこれまで報告さ

れていない新たな遺伝子変異を検索した。次に②結核菌の薬剤耐性遺伝子変異を、ナノポアシーケンサーを利用し短時間で網羅的に検出するため方法およびその反応条件、解析方法の検討を行った。

## \* 1 NGS のデータ解析に関する用語の説明

NGS のデータ解析は、大量の遺伝子情報を処理する必要性があることから、専用のコンピュタープログラムを利用するのが一般的である。従来のサンガー法とは異なる点が多いことから、ここで概略を説明する。

デマルチプレックス (demultiplex) : 塩基配列を記録した FASTQ データから、サンプルごとにデータを仕分けすること。仕分けする際には、サンプルごと個別のバーコード配列が必要となる。コンピュータ上でこのバーコードを認識し、それぞれのバーコードごとにデータをまとめて出力する(図 2 (A))。この際バーコードが無い、もしくは正しく認識できないリードは分類されず除外されるため、仕分け後のサンプルごとのリード数の総和は、入力時のリード数よりも少なくなる。バーコード配列の付加には専用のキットを用いてライゲーションを利用する方法のほか、本研究第 3 章のようにプライマー配列にあらかじめ付加することも可能である。

リシーケンス (re-sequence) : 本研究のように生物個体ごとの遺伝子配列情報を解読する手法。あらかじめ判明している塩基配列をリファレンス配列とし、各リードをリファレンス配列と比較することで、生物個体ごとの配列の全体像およびリファレンス配列と異なる変異箇所を特定していく。

マッピング (mapping) または アライメント (alignment) : 各リードデータ

(FASTQ 形式) をリファレンス配列 (FASTA 形式) と比較すること。一般的には FASTQ 形式のデータを入力し、SAM (Sequence Alignment / Map Format) 形式のデータを出力する (図 2 (B))。SAM ファイル内にはリードごとに、リファレンス配列のどの部位に相当する配列なのか、その精度などが格納されている。

BAM (Binary Alignment Map) 形式は、SAM 形式データを圧縮しコンピュータ上で扱いやすく変換した形式である。代表的なプログラムには Illumina など短いリード向けの “BWA”, “Bowtie” や、MinION など長いリードに適した “GraphMap”, “LAST”, “minimap2”, “marginAlign” などがある。

カバレッジ (coverage) または デプス (depth) : マッピング時にリファレンス配列の各塩基部位において、何本のリード (塩基数) がその部位にマッピングされているか、つまり同じところを何回重複してシーケンスしているかを表したものである。単位には、“-fold” もしくは “x” が頻用されるが、これは得られたデータがリファレンス配列の何倍の塩基量のデータか、に由来している。例えば 500 万塩基対の単一細菌ゲノムを解析して 5000 万塩基対のデータが得られた場合、カバレッジの平均値は 10 と概算される。カバレッジが大きくなれば、その配列を解読している情報量が多いことを意味し、より高い精度が期待できる。反対にカバレッジが少ない場合には、その部分を解読している情報数が少ないため、わずかな読み間違いが解析結果に影響を与える可能性がある。

Illumina 社の資料では、ヒトゲノムのリシーケンスで推奨されるカバレッジは 20-40 x 程度としている (25, 26)。リファレンス配列のない対象の解析 (*de novo* シーケンス) や、対立遺伝子 (ヘテロアレル) の検出精度を高める必要がある場合にはより高いカバレッジが要求される。

クオリティスコア : 塩基配列のシーケンス時には読み間違い (エラー) が発生する可能性がある。その確率を数値化したものがクオリティスコアである。一般的には Phred という形式が用いられ、計算式は以下のとおりである (27)。

$$\text{Qual} = -10 * \log_{10} P_{\text{err}}$$

[ Qual:クオリティスコア、 $P_{\text{err}}$ : エラー確率 (0 - 1) ]

クオリティスコアは数字が大きくなるほどエラー確率は低下し、信頼度が増す。例えば、クオリティスコアが “10” であれば、エラー確率は 10.0 % であり、読み取られた塩基の信頼度は 90.0 % と解釈される。同様に “20” であれば、エラー確率は 1.0 % になり、塩基の信頼度は 99.0 % となる (28)。

この定義を利用し、本研究第 3 章では理論的なカットオフ値の設定を行った。全体の塩基の平均クオリティスコアから、エラー確率を計算し、そのエラー確率からリファレンスのある一塩基部位において、正しい塩基数よりエラーの塩基数が上回る確率を計算する。その後エラー確率がリファレンス全体で一定だと仮定し、リファレンス全長において前述のようなエラー部位が 1 塩基未満にな

るような平均のカバレッジ数を概算し、これを理論的なカットオフの目安とした。

バリエントコール(variant call) : マッピングにより得られた SAM/BAM 形式データより、リファレンス配列と異なる塩基情報部位を特定・抽出する方法である(図 2 (B))。これにより VCF 形式(Variant Call Format)のデータを取得する。これにはリファレンス配列の塩基部位ごとに、対応するサンプルの塩基情報が記録される。ここから変異部位のみを抽出し、その変異の精度(クオリティスコア)を計算することが可能である。またさまざまな条件のフィルターをかけることも可能である。代表的なプログラムには Illumina データでよく用いられる “Genome Analysis Toolkit (GATK)” がある。ナノポアシーケンサー向けにも様々なプログラムが開発中であるが、本研究第 3 章では INDEL(insertion および deletion の意味)の解析も併せて行える汎用性の高い “bcftools” を利用している。

コンセンサスコール (consensus call) : VCF 形式のデータおよびリファレンス配列を利用し、サンプルごとの塩基配列情報を FASTA 形式として一義的に決定する方法である(図 2 (B))。

## 第2章 $\beta$ ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) インフルエンザ菌の

### 薬剤耐性に関する一塩基多型 (SNP) の解析

#### 第1節 背景

*H. influenzae* は小児から成人の肺炎・髄膜炎・敗血症などの起炎菌として広く認められるが、その  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する感受性は様々である。耐性機序は大きく2つ存在し、①  $\beta$ -ラクタマーゼの産生による  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の無効化、および② BLNAR においてはペニシリン結合蛋白質 (penicillin-binding protein 3, PBP-3) をコードする遺伝子 (*fts-I*) の変異により、 $\beta$ -ラクタム系の効果が低下すること (29-31)、がある。特に我が国では、2000 年以降に経口第三世代セフェム系抗菌薬等の多用に伴い BLNAR が急速に増加してきており、2012 年の段階では全株中 6 割強を占めるまでにいたっている (32-34)。このように *H. influenzae* は市中感染の主な起炎菌でありながら、多様な薬剤耐性を示すことから、適切な抗菌薬選択が困難な細菌である。

BLNAR 型の耐性は PBP-3 をコードする *fts-I* 遺伝子の変異が原因と考えられているが、その中でも SSN 周辺領域 (M377I, S385T および L389F) と KTG 周辺領域 (R517H および N526K) が主要な変異部位である。特に両領域に変異を有する菌はアンピシリン (ampicillin, AMP) に高い耐性を有するとされる (図 3) (35)。

この機序に基づいて PCR を利用した変異の簡易検出キットも市販されている (36)。

過去に私は共同研究者として、LAMP 法を活用した簡易かつ迅速な BLNAR 型変異の検出系の確立に参加したが、その実験過程において、表現型検査である薬剤感受性検査では明らかにならない潜在的な耐性遺伝子変異を有する例が一定数認められた (23)。また他の *H. influenzae* の研究においても、変異を有する感性株が存在することが分かっていた (37-39)。これらの情報から我々は、ペニシリン結合蛋白質に関する遺伝子領域を、全ゲノム情報を利用して網羅的に解析し、薬剤感受性検査の結果と照らし合わせることで、*H. influenzae* の潜在的な遺伝子変異パターンを明らかにすることを試みた。

## 第 2 節 方法

防衛医科大学校病院 微生物検査室において 2015 年～2016 年の間に同定された *H. influenzae* 菌株全 39 検体を対象とした。細菌学的な *H. influenzae* の同定には、標準的な検査法であるウサギ血液寒天培地の非溶血性および X 因子・V 因子の要求性を用いた (40)。MIC の判定は broth dilution 法を用い、耐性・感性の判定は Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) の基準に基づいて行った (41)。また  $\beta$  ラクタマーゼの産生能の確認は BBL Cefinase paper disc



kit (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を利用した。

-30℃で冷凍保管された各菌株はチョコレート寒天培地に植え付けたのち、5% CO<sub>2</sub>, 37℃の環境下で24時間培養後に回収した。DNAの抽出はEZ Extract for DNA kit (Advanced Microorganism Research, Gifu, Japan)を用いDNA抽出を行った。得られたDNAは東京大学 新領域創成科学研究科(千葉県柏市)の協力のもと、TruSeq nano DNAでサンプル調整を行い、Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA)を用いて100 bp paired-end readのプロトコルでシーケンスし全ゲノム情報を収集した。

得られたシーケンスデータについては以下のように解析した;1. リファレンス配列 (*H. influenzae* Rd KW20 complete genome を含む表1の塩基配列) に対してマッピング(42, 43)。2. 塩基変異の同定およびコンセンサス配列の確定。3. 解析に必要な箇所の配列を抽出。そののち、4. 16S rRNA および *recA* 遺伝子の系統樹解析および *fucK*, *hpd*, *sodC* 各遺伝子の確認による菌種同定、*BexDCBA* および *cap* の region II 領域による莢膜型の決定(44-48)。5. ペニシリン結合タンパクをコードする7領域 (PBP 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 7) の non-synonymous SNP (アミノ酸変異を伴う SNP) の同定および、それらの  $\beta$  ラクタム系およびセフェム系各抗菌薬の MIC に対する相関関係を Mann-Whitney U test で検証。6. 排出ポンプ系の変異部位として報告例のある *acrR*, *acrA*, *acrB* お

よび *tolC* 遺伝子について、アミノ酸変異を伴う non-synonymous SNP の同定および MIC との関連の検証を行った(49-52)。

遺伝子配列情報の解析や統計処理には Molecular Evolutionary Genetics Analysis software package (v 7.0.21)、Integrative Genomic Viewer、(v 2.3.81、以後 IGV と表記)および R (v3.4.0; R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. および Package “EnvStats”)を利用した(53-56)。

また上記とは別にサンガー法による *fts-I* 遺伝子の関心領域のシーケンスも行い、従来の遺伝子型分類 (genotype group) を以下の通り行った: gBLNAS ( $\beta$ -lactamase negative ampicillin susceptible): SSN, KTG 両領域に遺伝子変異を認めないもの; gBLNAR I: KTG 領域の N526K を有する; gBLNAR II: KTG 領域の R517H を有する; gBLNAR III: SSN 領域のいずれか1つ以上 (M377I、S385T および L389F) かつ KTG 領域のいずれかを有する; Other: 上記の基準以外のもの、例えば SSN 領域のみに変異を有するなど(57)。

第2章の研究は防衛医科大学校 倫理審査委員会の承認を得て実施した(審査番号 2521)。

### 第3節 結果

初めに集められた 39 検体中、 $\beta$  ラクタマーゼ産生菌 5 検体を除く 34 検体においてサンガー法により決定した *fts-I* 遺伝子の塩基配列に基づく既報告の genotype group ごとの AMP の MIC を統計学的に比較した。その結果 gBLNAS に比較して gBLNAR III (SSN, KTG 両領域に変異を有し、高い耐性を示すとされる群) では有意に MIC の上昇を認めたが、gBLNAR III 全 23 検体中に、MIC < 1  $\mu$ g/mL (AMP 感受性) となる検体が 10 検体 (43.5%) 存在した(図 4)。この結果から AMP の MIC 上昇は、既存の gBLNAR の遺伝子変異のみでは決まらない可能性を考えた。本研究で用いた菌株の情報を表 2 に示す。

この遺伝子型と表現形質の乖離と言う結果を受けて、我々はまず細菌学的に *H. influenzae* と同定した菌株の中に *H. parainfluenzae* および *H. haemolyticus* のような遺伝子学的に近縁種が含まれている可能性を疑い、明確に鑑別する必要があると考えた。鑑別方法として 16S rRNA 遺伝子のほか *recA* 遺伝子の系統解析および *hpd*, *fucK*, *sodD* 各遺伝子の確認を行った。その結果、34 検体中 2 検体は他の 32 検体と異なり *H. influenzae* が有する *fucK* を持たず、逆に *H. haemolyticus* が多く有する *sodC* を有していることから、他の 32 株と遺伝子学的に同一種であることを明白に示す基準を示さなかった。したがって、これら 2 検体は近縁種もしくは遺伝子学的にも明確に分類不能な “fuzzy species” の可

能性があると考え以後の解析より除外した。このほか本解析ではすべての菌株は *BexDCBA* 領域および *cap* 遺伝子を有さないことから遺伝子学的に無莢膜型の *Haemophilus influenzae* であった。

続いてペニシリン結合蛋白質をコードする全7領域 (PBP 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 7) において、MIC と有意に相関するアミノ酸置換を伴う non-synonymous SNP を検索した。この際、32 株中5株において、データ量の不足から上記7領域の塩基配列情報の一部に欠損を認めたため除外し、全27株に対して解析を行った。その結果これまで報告されている *fts-I* 遺伝子の SSN 周辺領域の SNP (D350N, S357N, M377I, S385T および L389F) および KTG 周辺領域に位置する V562L において MIC に有意差が認められたものの、それ以外の領域には有意差を認める SNP は認めなかった (図5)。各 SNP 同士は互いに高い正の相関関係を有していた (表3)。

排出ポンプ系の変異部位 (*acrR*, *acrA*, *arcB* および *tolC*) も併せて解析を行ったが、内部に non-synonymous SNP を認めた *acrB* においても変異の有無と MIC に相関は認められなかった (表4)。

#### 第4節 考察

本研究では、ペニシリンの活性部位である PBP と表現型との関係を、NGS を用いて網羅的に解析することに成功した。結果からは、当初予測していた新規の一塩基多型の発見には至らなかった（図5）。しかし、既報告にある SNP のいくつかは MIC を用いた表現型上の抗菌薬感性株においても高頻度で認められ、BLNAR 型を規定する耐性遺伝子は既に感性菌株にも広く存在していることが明らかになった。また SNP 同士が高い正の相関関係で認められたことから、遺伝子の水平伝播の可能性を示唆していた（表3）(58)。本研究では KTG 周辺配列の代表的変異である R517H および N526K には統計学上の有意差を認めなかったが、その理由として第一に頻度の問題が考えられた。N526K においては本研究で用いた菌株の多く（19/27 株）にみられたこと、および R517H は頻度が少なかった（3/27 株）（表2）。第2に、KTG 周辺配列単独の変異では、AMP の MIC 上昇にそこまで大きな影響を与えなかったことが考えられた（図5）。SSN 周辺配列単独での変異が抗菌薬耐性にどれほど寄与するかについては、対象となる菌株が 1 株と少なく本研究では結論付けられなかった。

本研究では第3セフェム系抗菌薬であるセフォタキシム (CTX)、セフトリアキソン (CRO) についても SSN、KTG 周辺配列の SNP と MIC の間に相関関係を認めた。ただし、本研究の菌株における最大 MIC はそれぞれ 1、0.25  $\mu\text{g/mL}$  であり、

いずれも CLSI の breakpoint からは感受性となることから、BLNAR 型インフルエンザ菌の感染症に対して第 3 世代セフェム系抗菌薬を使用することは適切と考えられる。

遺伝子型と表現型の乖離の原因としては、1. 従来の培養を利用した薬剤感受性試験では、使用する菌量のばらつきが MIC の結果に影響を与える可能性があることが過去に報告されている (59)。2. 従来の微生物検査では判別困難な近縁種の混在が結果の解釈を複雑化させている可能性が考えられた。今回除外した 2 株は遺伝子塩基配列の解析では *H. influenzae* より *H. haemolyticus* の特徴を有していた。2 つは時に細菌学的・分子生物学的にも鑑別困難なことがあり、“fuzzy species” と分類されることがある。*H. haemolyticus* や “fuzzy species” の薬剤感受性に関してはデータが少なく不明な点が多い (46, 49, 60-63)。3. 今回解析したペニシリン結合蛋白質という抗菌薬の作用部位以外の領域の遺伝子変異が薬剤耐性を誘導もしくは制御している可能性については否定できないものと考えられた。PBP の蛋白質配列の変異は本研究と共に多数の報告があり、本研究で *fts-I* 遺伝子に耐性変異を持たない gBLNAS では AMP 耐性株を認めなかったこと (図 4) や蛋白質レベルでの研究結果からも間違いない生物学的現象であると推察されるが、遺伝子型の変異が表現形質の変化に矛盾なく直結するか否かについては議論が多い。ほかの耐性菌と比較すると、MRSA では

既存の PBP1～4 のほかに、PBP2' (PBP2a) を獲得することで耐性化することが知られている (64-68)。しかし PBP2' をコードする *mecA* 遺伝子を保有しているにも関わらずメチシリン耐性を示さない菌株も確認されている (代表的なものに strain N315 がある)。これらは *mecA* の上流にある *mecI-mecR1* が *mecA* 遺伝子の発現を抑制または制御しているためと考えられている (69-72)。ただし臨床現場ではほぼすべての MRSA はこの制御遺伝子に変異もしくは欠損により機能が失われているためメチシリンに耐性を示している。Strain N315 のような菌株は抗菌薬の暴露により制御遺伝子に変異しやすいとされており、潜在的な耐性菌である “pre-MRSA” と認識されている (73, 74)。このような複雑な耐性遺伝子の制御機構は細菌のほか原虫などでも報告例がある (75)。

インフルエンザ菌ではこれらの制御機構は明確には発見されていないが、例えば変異した PBP-3 が存在してもそれらの発現を制御・調節することで耐性を示さないような機序が存在する可能性はありえると考えられる。したがって、本研究で解析した既報告の PBP の遺伝子変化に加えて、複合的に他の遺伝子変異が同時に誘導されなければ表現形質の変化にまでは至らないという可能性は十分にあるものと推察される。同時に耐性遺伝子型を有する感性株についても、今後耐性株へ変異する可能性は十分考えられるため、注意深い経過観察が必要と考えられる。

### 第3章 ポータブルシーケンサーによる薬剤耐性結核菌の迅速診断

#### 第1節 背景

近年、我が国においても薬剤耐性結核が無視出来ない問題となっている。国立感染症研究所の統計によると多剤耐性結核 (MDR-TB) は日本国内感染例で治療歴のない者においては 1%以下と少ないものの、治療中断例や国外（特に東南アジア・中国）からの輸入例などが国内での出現の契機となりうる(76)。

結核治療の原則は、耐性の誘導を防ぐため感受性を有する複数の薬剤を一定期間併用する、いわゆる「多剤併用療法」を行うことである(77)。この中でも特にイソニアジド (INH) およびリファンピシン (RIF) は重要な薬剤である。例えば RIF 耐性結核の中には、高頻度ではほかの抗結核薬への耐性を有するものが多いとされる(78)。抗結核薬に対する耐性獲得は標準治療を困難とするため、治療失敗例が増加し死亡に至る例も多い (79, 80)。WHO の統計では MDR-TB / rifampicin resistant (RR)-TB は世界中で約 60 万人の患者がおり、年間 24 万人が死亡している。

結核菌の薬剤感受性検査はわが国では液体培地を用いた方法が一般的であるが、菌の培養と合わせて結果判定まで 2～8 週間かかり迅速性に重大な問題がある。また標準治療薬の一つであるピラジナミド (PZA) は培養法による感受性試験の実施が難しく、日常業務として行うことが難しいなどの問題点もある(81)。

一方、結核菌の遺伝子配列解析の進展に伴い、薬剤耐性と遺伝子変異との関連



性が詳細に調べられるようになった(82)。そして前述の問題点を補うために、遺伝子変異に基づく耐性検出方法が研究・開発されている。

遺伝子検査法として商業ベースで国内・国外を問わず広く利用されているのが GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) である。喀痰を直接利用でき、菌検出のみならず RIF 耐性に関与する *rpoB* 遺伝子の変異を検索できる。またカードリッジ化された試薬を利用することで簡便かつ迅速に、結果判明まで約 2 時間弱で検査を行うことが可能であり WHO の推奨を受けた検査法である(83, 84)。ただしこのキットは *rpoB* 遺伝子内の hot spot と呼ばれる 81 塩基対の領域のみを調べており、近年報告例のある hot spot 外の変異部位およびそのほかの領域や他薬剤の耐性はカバーできておらず、またアミノ酸変異を伴わない synonymous mutation 等は偽陽性となるなどの問題点もある(85-91)。そのほか WHO 推奨の Hein Life Science 社の Line Probe Assay があるが、こちらも複数の薬剤耐性に関与するパターン化された変異の検出には有用だが、それ以外の領域の網羅的な検出や塩基配列の確認は不可能である(92)。

これらの問題点を克服するには遺伝子配列の塩基配列情報が必要である。ただし標準的なサンガー法では複数の領域を網羅的に解析するには手間や時間がかかり、また Illumina 社などが販売する据え置き型の NGS は非常に高性能である反面、本体価格のみで 1000 万円超と設備投資にかかる多額のコストや煩雑な

サンプル調整の問題があり小規模な検査機関において簡便には行えない。外部業者への委託でもデータ取得まで1～2か月ほどかかる場合が多く、少数検体の解析には向かない。

近年登場した USB 接続式のポータブルシーケンサーMinION™(Oxford nanopore technology, Oxford, England) は、ナノスケールの穴を DNA 鎖が通過する際の電位差を利用した USB 接続式のシーケンサーである。片手に収まる程度の本体であり携帯性を有し、コスト・設備の点から簡便に導入可能な NGS として期待されている。また複数の長さの異なる遺伝子鎖を断片化しなくても同時に解析可能であり、さらにほかの NGS 同様バーコード配列を使用することで複数サンプルの同時解析やリアルタイムのデータ取得など網羅性・迅速性に優れている。このような特徴から臨床現場でも応用例が既に報告されている (93-99)。

塩基配列決定の対象部位に関しては近年 NGS の性能の向上により結核菌の全ゲノムシーケンス(whole genome sequence, WGS)も可能となったが、微量な DNA 量における全長の正確な把握方法は十分確立されていない(100, 101)。それに対して PCR を利用するアンプリコンシーケンスは対象領域が限定される一方で、微量検体からの検出効率が高まることが期待できる(102, 103)。

本研究では結核菌 DNA 検体を用い、マルチプレックス PCR 法により抗結核薬への耐性に関与する複数の遺伝子領域を増幅し、それをナノポアシーケンサー

により複数サンプルの複数遺伝子領域を同時に解析することで、短時間でかつ網羅的な結核菌の遺伝子塩基変異同定手法の確立を試みた。

## 第2節 方法

初めに、ナショナルバイオリソース(<http://www.nbrp.jp/>)より譲渡を受けた結核菌 DNA 3 株の DNA (Japan National Collection of Bacterial Pathogens; JNBP no. 03690、03706 および 03693)を用いて実験系の確立を行った(表5)。

標準治療で用いられる5剤であるイソニアジド、リファンピシン、エタンブトール(EMB)、ストレプトマイシン(STR)、ピラジナミドおよび2次治療薬として繁用されるキノロン系の全6薬剤を対象とし、これらの薬剤耐性と関連があるとされる主要な遺伝子のうち全15領域に対して primer BLAST (米国国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information、NCBI) , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> 2019/5/31 確認)を用いて16組のPCRプライマーを設計した(表6)(104-121)。この時、すべてのプライマーが同一のPCR条件で機能するように、 $T_m$  (melting temperature, 融解温度)を  $60 \pm 1$  °Cの狭い範囲に収まるように設計し、またPCR結果を1つの泳動レーンにおいて確認できるように1プライマーセットに含まれるPCR産物の同じにならない4つのプライマーセット(A~D)を設計した。4つのプライマーセ

ットに分割した理由は泳動時のバンド確認を容易にするためである。また *rpoB* 遺伝子領域の PCR 産物を 2 つに分けた理由は、予備実験において *rpoB* のほぼ全長（約 2700 bp）を 1 組のプライマーで増幅した際、ほかの産物に比べ十分な量の産物を得られず、それによりマッピング時にカバレッジが他の領域に比較して非常に低くなる傾向にあったためである。また 2 つに分割する際、hot spot である 81 bp の領域を重複するように設計し同部位の精度向上を図っている。

さらにコスト削減を目的に Forward プライマーの 5' 末端に固有のバーコード配列を挿入した。この工夫により、バーコード付加に要するステップを省くことが可能となりマルチプレックス PCR 時に同時にバーコード付加が可能となり、またシーケンス時の消耗品に当たるフローセル 1 枚あたり最大 3 サンプルまで同時に解析が可能となった。バーコード配列の設計は Oxford Nanopore Technology 社の chemistry technical document (<https://community.nanoporetech.com> 内、ログインが必要、2019/5/31 確認) を参考とし以下の通りに設計した；先頭：3'-GGT GCT G + 固有配列（BC01: AAG AAA GTT GTC GGT GTC TTT GTG、BC02: TCG ATT CCG TTT GTA GTC GTC TGT、BC03: GAG TCT TGT GTC CCA GTT ACC AGG）+ 末尾：TTA ACC T-5'。

マルチプレックス PCR に使用する DNA 量の検証には結核菌と配列が類似する *M. bovis* DNA（JNBP no. 03764）を用いた。PCR 酵素には KOD Multi & Epi

(TOYOBO, Osaka) を用い、1 反応チューブ当たり 100 pg~1 fg までの DNA 量を使用し、当初は 94 °C・2 分の初期熱変性ののち、98 °C・10 秒、58 °C・30 秒、68 °C・180 秒を 35 サイクルの条件で PCR を行った。結果は Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) および Agilent DNA 7500 kit (Agilent, Santa Clara, CA) を用いて確認した。

結核菌株 DNA のマルチプレックス PCR は前述の条件を参考に行い、Agilent Bioanalyzer 2100 および DNA 7500 kit でサイズ確認および濃度計算を行いモル濃度が均一になるように混合し、MinION のシーケンスライブラリーとした。

上記 PCR 産物は別に Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) の同一 DNA 断片を両端から解読する 300 bp paired-end read でもシーケンスを行い、2 つの解析系の一致率を検証した。MiSeq の変異部位同定方法については BWA, samtools / bcftools および GATK などの解析プログラムを利用した (42, 43, 122)。

MinION の塩基配列決定シーケンスプロトコールは、決定塩基精度を高めるため 1D<sup>2</sup> を用い、サンプル調整には 2018 年 9 月時点で最新であった 1D<sup>2</sup> Sequencing Kit SQK-LSK308 を使用した。本手法・機器は市販されてから日が浅く独特なデータ処理手順が必要であることから、一般には耳慣れない用語が多くあり\*2に説明を加えている。

まず得られた生データ (FAST5 形式) は電気信号データであるため、信号から塩基情報への変換 (ベースコール)、データの質のチェック (クオリティチェック)、バーコード配列に基づく分類 (デマルチプレックス)、リファレンス配列への参照 (マッピング) および変異部位の検出 (バリエントコール) などのデータ処理手順を行うことで、各サンプルの塩基配列および遺伝子型を決定した。リファレンス配列には NCBI データベースより *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3) を参考とし、各解析対象領域を抽出した配列を利用した。MinION はリアルタイムで FAST5 形式のデータを出力することを利用して、先頭より複数のデータ量でサンプリングしたものをそれぞれ解析し、データは 1 サンプル当たり 12,000 - 400,000 ファイルで、これらは 1 ファイル当たり 1 リードを含むものである。本稿では以降 1000 ファイルを “1 k” と表記することにする。最終段階では塩基配列の正確性を検証し、最適なシーケンス時間およびデータ量の検討を行った。なお実際にはシーケンス時間は最大 48 時間まで延長可能でありさらに多くのシーケンスデータを取得可能であるが、400 k を上限とした理由はデータ量の増加に伴い別途行うベースコールに要する時間および必要な HDD 容量が大きく増加することによる。例えば Run1 における 48 時間の全シーケンスデータをベースコールするには市販のラップトップ PC の内蔵 HDD では容量不足となる可能性が高く、またベースコール時間だけでも 1 週間以上か

かることが予想され本研究の目的に合わないとは判断した。

MinION のデータ処理手順には以下の解析ソフトを利用した；ベースコール：Guppy (v3.1.5, Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK)、クオリティチェック：Poretools (v0.6.0) (123)、Nanoplot (v1.20.0) (124)、デマルチプレックス：Porechop (v0.2.4)、マッピング：GraphMap (v0.5.2) (125)、バリエントコール：bcftools、SeqKit (v0.10.0) (43, 126)、MUSCLE (v3.8.1551) (127)。バリエントコールの際、変異のクオリティスコアが 30 未満（信頼度が 99.9%未満）は除外した(128-130)。また結核菌のような原核生物は一倍体であることから、変異部位が二倍体を意味するヘテロ接合体（以後ヘテロアレルと表記）と判定されたものはこの段階で除外した。

本研究で得られたシーケンスデータは Sequence Read Archive (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, 2019/5/31 確認)に登録しており、以下の Accession Number が付与されている；MinION:PRJNA534373、MiSeq:PRJNA534357。また本研究で同定した *rrs* 遺伝子領域は 16S rRNA に相当することから、GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> 2019/5/31 確認)に登録している (Accession Number: MK828209-828216)。

## \* 2 ナノポアシーケンサーMinION について(131)

ナノポアシーケンサーとは、ナノスケールの穴を DNA 鎖が通過する際の電位差を利用した新しいシーケンサーである。2019 年 6 月現在、Oxford Nanopore Technology 社(Oxford, England)からは MinION をはじめとしたさまざまな機種が販売されている。

MinION のシーケンスメカニズムは以下のとおりである。まず専用のサンプル調整キットにより、サンプル内の各 DNA 鎖の末端にアダプターと呼ばれる蛋白質からなる構造を結合させる。この構造はセンサー孔と結合し DNA 鎖をセンサー内に誘導する役割を有する。これにより DNA 鎖はセンサーを通過し、その電気信号がコンピュータに記録されていく(図 1 (A))。

ベースコール (base call) とは、シーケンサーから得られた生データを塩基配列情報に変換することである。サンガー法では波長光のシグナル強度の時間的変化を記録した波形から塩基情報に変換することを指すが、MinION では、生データは FAST5 形式で出力される。これは HDF5(Hierarchical Data Format 5)の一種であり、内部に階層化された様々なデータを有しているが、特殊な構造であることから内部の確認には特別なプログラムが必要であり、また出力時点ではシーケンスデータは電気信号の波形データとして記録されていることから、人間が理解可能な FASTA もしくは FASTQ 形式の塩基情報に変換する必要がある



(図 1 (A) 右下)。この手順では Oxford nanopore technology 社が公式に提供しているプログラムを利用するのが一般的である。MinION 発売当初はウェブ上にあるクラウドベースの解析環境が必要であったが、現在は解析環境の利便性、解析速度および精度の向上が図られている。2019 年 6 月現在においては Guppy v3.1.5 が最新プログラムであり、そのほかいくつか解析用プログラムが発表されている (132-134)。

“1D<sup>2</sup> (1D スクエアと呼称)” とは、MinION シーケンスプロトコールの一つである。MinION にはそのほか大きく分けて “1D” というプロトコルがある。1D<sup>2</sup> は、相補配列となる読み取った塩基配列断片 (リード) 同士のペアを確認することで、1D よりも一つ一つの塩基の精度が高くなることが特徴である。これはサンガー法における Forward / Reverse プライマーを利用した両方向からの配列解析と類似した方法といえる。1D<sup>2</sup> プロトコルはサンプル調整キット自体が 1D とは異なるが、これは相補関係にある 2 本のリードがセンサー部位を連続して通過できるよう特別に設計されたアダプターを利用しているためである。ベースコール時は、まず一度 1D ベースコールによりすべてのデータを 1D として塩基配列情報に変換したのち、ペア同士を確認する。この際、ペアを確認できないリードは除外されていくことからデータ量自体は 1D よりも減少する。

MinION はコンピュータ上から制御するため、専用プログラムである “MinKnow”

が Oxford Nanopore Technology 社より提供されている。ホームページにログインすることで入手可能であり Windows / Mac / Linux で動作可能である。本研究の MinION シーケンスのうち Run1 および Run2 は 2018 年 9 月に実施しているが、この時点で利用可能であった MinKnow version 18.05.5 では FAST5 形式の出力ファイル 1 つに対し、1 つのリード情報が含まれる single-read fast5 であった。その後 2018 年 12 月 18 日よりリリースされた version 18.12 以降では、1 つの FAST5 形式ファイルに複数のリード情報が含まれる (multi-read fast5) ように仕様変更となった。Run1 および Run2 では MinKnow version 18.05.5 を、Run3 では MinKnow version 18.12 を利用している。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 ナショナルバイオリソース譲渡の検体を用いた実験系の確立

最初に、マルチプレックス PCR に用いる DNA 量の決定のために行った、*M. bovis* の PCR では、1 反応あたり 10 pg の DNA まですべての目的の PCR 産物を確認することができ、加えて 10 pg までの DNA 使用条件で非特異的なバンドの増幅が最小限に抑えられていることも明らかになった (図 6)。この結果から、以後結核菌のマルチプレックス PCR においては、1 反応あたり 10 pg を用いることとした。上記の DNA 量で結核菌 3 株のマルチプレックス PCR を行った結果で

もすべてのプライマーセットで目的とする産物の増幅が確認され、また非特異的バンドも抑えられた (図 7 (A))。以上から、このプライマーセットおよび PCR 条件が結核菌の DNA 検出および調製に対して有効であることが証明された。なおマルチプレックス PCR では複数のプライマーが混在しており、通常の PCR と比較してプライマー間の相互作用および非特異的産物の形成が起こりやすいことが知られている (135-140)。さらに今回は固有のバーコード配列を付加しており、Forward プライマーは 50 bp 程度の長さとなることから、通常より非特異的産物が生成されやすいと予想された。しかし以降のデータ解析においてこれら非特異的産物はマッピング等の段階で除去が可能であると判断し、この時点では目的の産物の増幅をもって PCR の成功とした。

この PCR 条件で、ナショナルバイオリソースより譲渡の結核菌 3 株のサンプル調製を行った。今回は Bioanalyzer の定量結果をもとに最も少ない遺伝子産物が 1 nmol/L となるように 4 反応チューブの産物を混合した結果、最終的なシーケンスライブラリーの DNA 量は 544.5 ng となった。以後この 3 株のシーケンスおよびデータ解析を “Run1” と呼称する。

MinION のデータからは 1 サンプルあたり 60 k ファイル (180 k / 3 サンプル、以降特に明示しない場合には 1 サンプルあたりのデータ量で表記する) のデータ量で、全 15 領域において *rrs* 遺伝子内の 1 か所を除くすべての SNPs の同定

ができることが分かった(表 7 (A), (B), (C))。このデータ量のシーケンス時間は約 22 分であった。1D<sup>2</sup> ベースコール時にリード数は 75-80 %減少するものの、SNP の同定には十分であることが判明した (図 8)。

ベースコール後のデータの平均クオリティスコアは約 6 であり、これから求められる理論的なカットオフの目安は 13 であった。各領域におけるカバレッジはリード長の違いがあるため異なる値を示し、60 k における各領域の平均カバレッジは Run1 内で最低となる MDRTB2 の *embB* 遺伝子領域が約 15.0 であった。ただし一部の塩基部位では 13 を下回っていた。データ量を約 36 分のシーケンス時間となる 100 k まで増やすことで、MDRTB2 の *embB* 遺伝子領域のほぼすべての部位でカバレッジは 13 を上回った (図 9)。このことから、MinION による塩基配列決定における初期のデータ量の目安は 60 - 100 k 程度が信頼性を確保できる目安となると判断した。

MiSeq のシーケンス時間が一般的に 48 時間であることと比較すると、今回使用した市販のラップトップ PC を使用した 100 k のベースコール時間を加味しても MinION では約 24 時間程度で塩基変異情報が得られた。なおベースコールに要する時間は PC の性能および動作環境に大きく依存するため一般化は困難であった。

一方、*rrs* 遺伝子領域 (16S rRNA に相当) では誤ったデータのマッピングが発

生することで、1 か所塩基変異を正しく判定できない例が存在した（表 7 (C) の *rrs* 遺伝子領域）。これは *rrs* 遺伝子領域に、*Mycobacterium* 属以外のリードがマッピングされることでヘテロアレルと判定される多数の SNP が検出されてしまうことに起因していると考えられた。これに伴い真の SNP もヘテロアレルと判定され除外されてしまっていた。これら誤ってマッピングされている塩基配列の詳細を NCBI が提供する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) で確認すると、データベース上は“uncultured bacterium”や“*Corynebacterium* 属”、“*Micromonospora* 属”、“*Sphingomonas* 属”、“*Streptomyces* 属”等に該当することが判明した。そこでスタンドアロン環境で利用可能な local BLAST を利用したフィルタリングプログラム（\*3）を開発することでこれら目的外の塩基配列を除去し、*rrs* 遺伝子領域内の塩基変異を正確に同定できた。このフィルタリングはほかの 2 サンプルに適用した際にもカバレッジへの影響はほぼ *rrs* 遺伝子領域に限られ、その減少もごく軽度であった。（図 10）。他領域に影響がない理由として、*rrs* 遺伝子以外の 14 遺伝子領域は *Mycobacterium* 属に特異的な配列であるからと考えられた。

その反面、MinION を用いる際の問題点についても示唆が得られた。MiSeq で確認された 2 か所の short insertion については、必ずしも MinION から出力された初期データ量を増やすことでも検出感度が上がるわけではないことが明らか

となった(表 7 (B), (C))。この 2 か所はサンガー法では確認できたことから MinION のデータのほうに誤りがあると考えられた。

さらに、一部のサンプルではデータ量を変化させた際に偽陽性となる deletion が増加することが判明した。これらの deletion は MiSeq では確認されず、また遺伝子領域内の deletion では翻訳されたアミノ酸配列自体がフレームシフトを起こし大きく変化してものが多いことから、正しい deletion とは考えられなかった。これはいくつかのサンプルではデータ量の変化に際し deletion を誤検出しているためと考えられた。MiSeq との一致率低下の主な原因の一つにこの false deletions にあった (図 1 1 (A) 中段)。偽の INDEL が MinION では MiSeq より多くみられることはこれまでの報告でも指摘がなされており (141, 142)、今回の実験では MiSeq と比較して約 100 倍前後の INDEL が検出されていた(表 8)。

なお、マッピングされずにデータが欠損する恐れがある領域については早期の段階で消失していた (図 1 1 (A) 下段)。

### \* 3 BLAST フィルターについて

本研究では *rrs* 遺伝子領域の SNP 検出精度を高めるために BLAST を用いたフィルタープログラムを開発した。BLAST は NCBI が提供する配列解析のアルゴリ

ズムであり、さまざまな塩基配列およびアミノ酸配列をデータベースと照合し、それらの由来を特定する利用法が一般的である。NCBI のサイトからブラウザ上で直接利用する方法のほか、プログラムおよびデータベースをダウンロードしてスタンドアロンのコンピュータ上で利用する方法(local BLAST)もある。本研究では local BLAST を解析プログラムに組み込み利用している。まずベースコールおよびデマルチプレックス後の FASTQ 形式データを入力し、すべてのリードごとに該当するデータベースの名前を決定(トップヒットの抽出)し、その後“*Mycobacterium* 属”ではないリードを除外することで目的の FASTQ データ(以後“filtered”と呼称)を出力した。本研究の手法は今後臨床応用を考えるうえで *rrs* 遺伝子領域に他菌種のデータが混在することは不可避であることから、本プログラムが結果の信頼性向上に有用であると考えた。

## 第2項 防衛医科大学校病院 微生物検査室の検体を用いた解析

次に、防衛医科大学校病院 微生物検査室に保管されていた検査用の結核菌株 DNA に対しても MinION を用いた解析手法が適応可能かを検証した。本検体は、検査室で過去に分離された結核菌の一部を検査目的で継代保管していたものである。分離時の臨床情報は添付されていないことから、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイダンス(平成29年5月29日改定)」第1章第2の

5に基づき取り扱うこととした。

当初 NDMCTB1 および NDMCTB5 の 2 株を用い、Run1 と同様の解析を行った（表 5、以後“Run2”と呼称）。結果としては前に述べた結果とほぼ同様であった（表 7 (D), (E)）。ただし、false deletions の問題も同様に浮彫りになった（図 1 1 (B) 中段）。この 2 検体では薬剤耐性と関与する変異は認めず、また INDEL も検出されなかった（表 7 (D), (H)）

さらに PCR 条件を 94 °C・2 分の初期熱変性ののち 98°C・10 秒、68°C・180 秒を 35 サイクルの 2 ステップへと短縮化を図り、Run2 とは別の結核菌株 DNA 3 株（NDMCTB2-4）に対してもシーケンスを行った結果（表 5，以後“Run3”と呼称）、9 割以上の塩基精度および耐性遺伝子変異の検出が可能であった。ただし、一か所確認された NDMCTB4 の *gidB* 遺伝子内の deletion は MinION では同定できず（表 7 (E), (F), (G)）、false deletions の問題も同様であった。（図 1 1）。

### 第 3 項 MinION で同定困難な塩基変異部位の検証

前述の Run3 において、NDMCTB3 の *pncA* 遺伝子領域の塩基変異は耐性に関与する部位にも関わらず MinION での検出とデータ量との関係にばらつきを認める結果であった。そのためこの理由を詳細に検討することとした。

その結果は図 1 2 (A)に示す通り、どのデータ量においても最も優位な塩基は



変わらないにもかかわらず、バリエントコールでは正しい変異として同定されないことがあることが判明した。バリエントコールで用いた bcftools の内部動作については複雑なため省略するが、同変異部位はマッピング結果によってバリエントコール時にヘテロアレルとして認識されることがあり、それがフィルターにより除去されることが原因と考えられた。変異の決定は必ずしも塩基構成割合のみで行われているわけではなかったが、MiSeq では同部位はほぼ単一の塩基で構成されており正しく解読されており、優位な塩基以外の結果は MinION のエラーによるものと考えられた。

そこでヘテロアレルを除去しないプログラムでも検証を行ったが、この場合は本来の変異部位ではない領域に変異が出現することがあることが確認された。このうち 2 か所の塩基構成割合を図 1 2 (B) に示す。プログラムは必ずしも優位な塩基を検出しているわけではなく、単純な塩基の割合の変化以外の要素も考えられたが、この図からはいずれも最も優位な塩基が正しい結果であると推測した。

上記の結果を踏まえバリエントコール時のフィルタリングを再検討し、ヘテロアレルと判定される SNP のうち変異を有するリードのカバレッジがリファレンス配列と一致するリードのカバレッジを上回る部位を除外せずに残すようにした結果、これらの変異部位の多くを正しく拾い上げるようになった (表 9)。

#### 第4節 考察

以上より、マルチプレックス PCR 産物を用いた MinION による結核菌 DNA の網羅的変異解析は、短時間で SNP 同定が可能であることが示された。ただし INDEL の判定、特に一部のサンプルデータで確認された偽陽性となる deletion が利用するデータ量の変化に応じて検出される現象については今後改善が必要であることが示唆された。この問題の理由については MiSeq に比べ一つ一つの決定塩基精度の低い MinION のデータにおいて、カバレッジが変化することでエラーが多く蓄積された際に検出されることが原因の一つではないかと推察された (143-145)。またエラーの多い MinION のデータ解析に特化した解析ツールが十分開発されていないことも一因と考えられた (146)。コンセンサス配列の精度を上げるためにはデータ量を増やすことが一般的ではあるが、本研究のような MinION の INDEL も含めた解析においてはかならずしもこの常識が正しいわけではないと考えられた。解決策として、ひとつに偽陽性の大きな deletion を抑制するためには逆にある程度初期のデータ量を抑える、例えば本研究の実験系でいえば 400 k では多くのサンプルで偽陽性である deletion が複数のサンプルで認められたため、その際には 60 - 100 k にデータ量を抑制するという方法である。また INDEL がアミノ酸をコードする部位の内部にあれば、翻訳されたアミ

ノ酸の配列も検証し、通常では考えにくい大きな変化、特にフレームシフトが起こっているようであれば初期のデータ量を増減させて再度解析する、などが考えられた。ただし NDMCTB4 の *gidB* 遺伝子のように deletion によるフレームシフトが耐性化を誘導するような場合もあるためその区別については注意が必要である。

またいくつかの変異部位はデータ量の違いによりヘテロアレルと判定されてしまう部位が存在することが判明した。結核菌は原核生物であり一倍体であることから、二倍体生物にある対立遺伝子は合理的にはない。ただし多くの NGS 解析プログラムはヒトゲノムを対象としているため、プログラムの判定上今回のようなヘテロアレルと判定される場合がある。今回認められた上記の箇所は MiSeq ではいずれもほぼ単一の塩基で構成されており、MinION に特有のエラーであることが示唆された。MinION のエラー率は MiSeq に比較して高いとされており (141, 142)、この違いは本研究でも確認された (表 8)。このような変異部位の一般的特徴をすべて一義的に説明することは現時点では困難であったが、最終的には IGV 等のプログラムでマッピングデータを目視により確認することで正しい変異情報か否かを判断することは可能であると考えられる。サンガー法でも波形データの確認は重要だが、次世代シーケンサーにおいてもマッピングデータの確認の重要性が改めて確認された。

*rrs* 遺伝子領域 (16S rRNA) の BLAST によるフィルタリングは同領域の SNP 同定に有用であった。この遺伝子領域は他の一般細菌でもみられる領域でもあり、相同性もほかの領域と比べ高いと考えられる。300 bp と短いリード長でシーケンシングした MiSeq のデータでは同現象が確認できなかったことから、リード長の違いと相同性との問題によるマッピングエラーである可能性が推測された (147)。今後臨床検体から直接 PCR 等を行う際には他菌種の 16S rRNA による影響が考えられることから、BLAST によるフィルタリングは同領域の変異特定に重要不可欠なものになることが我々の結果から予想される (148-150)。

今回の実験系により、結核菌を DNA サンプルから薬剤耐性変異の同定を行うことが可能であった。最終的には MDRTB2、MDRTB3 では RIF、INH を含む多剤耐性が予想された。また NDMCTB3 がピラジナミド耐性 (*pncA*)、NDMCTB4 がストレプトマイシン耐性変異 (*rrs*, *gidB*) を有していると判定された。残念ながら後者 2 株は発育状況が悪いことから研究実施中の表現型の検証はできなかった。

そのほか同定された塩基変異の中には、アミノ酸変異を伴わない non-synonymous SNP も含まれていたが、それらのいくつかに関しては、いずれも薬剤耐性と直接的に関連はないものの菌株の系統解析には重要な意味を持つもの (*gyrA* の S95T・G668D、および *gidB* の E92D) も含まれており、今後疫学的解析への応用も可能と考える (151-155)。

本研究の意義として、第一に PCR を利用していることから、微量の DNA からシーケンスを行うことができるため、今後は喀痰などのサンプルから直接 DNA 増幅を行い変異解析ができる可能性が期待できる点である。また 1 回のシーケンス当たりのコストは、バーコード付加プライマーを利用することで 1 サンプル当たりの費用は削減を図ることが可能である。

第二にリアルタイムに出力されるシーケンスデータを利用して、適切なシーケンス時間および条件を検証した点である。データ量の変化が最終的なコンセンサス配列に影響を及ぼすことや、複数条件での検証およびマッピングデータの確認が重要であることが明らかとなった。バリエントコール時のフィルター条件の検証により、変異部位の同定については向上したものの、結果的に単一の時間または条件決定には至らなかった。その原因の一つとして MinION の高いエラー率が考えられる。バリエントコール自体は NGS 解析の大きなテーマの一つでもあり、今後 MinION の特徴を考慮した解析条件のさらなる改良が課題となった(128-130, 146)。

第三に目的外の塩基配列のマッピングによる影響を受けやすい *rrs* 遺伝子領域の変異決定を、local BLAST を利用したフィルタリングにより克服したことがある。これにより今後臨床検体から直接 PCR を利用して同部位の変異決定が期待できると考えられた。

本研究で確立した手法は様々な場面で有用になることが期待される。第一に既存の迅速検査系、特に Gene Xpert で RIF 耐性と判定された検体の網羅的な薬剤感受性の判定である。RIF 耐性は薬剤耐性結核菌の中では頻度が高く、また RIF 以外の薬剤に対しても耐性を有している可能性が、RIF 感受性株に比べて高いことが知られている (78)。そのため RIF 耐性と判定された際には、そのほかの薬剤耐性の有無も速やかに調べる必要があると考えられる。Gene Xpert は迅速性・簡便性に優れているが、それを補完する形で DNA 検体から遺伝子型を判定することが可能な本研究系は有用であると考えられる。

第二に、発展途上国等における限られた設備しかない検査室における薬剤耐性の判定方法として活用することである。我が国における薬剤耐性結核の割合は低いものの、世界的には公衆衛生上の脅威の一つとして知られており、発展途上国、特に東南アジアは MDR-TB を含む薬剤耐性結核が蔓延している (2, 156)。しかしこれら発展途上国の多くにおいては、病院や診療所の検査室に結核菌の検査のための設備が施設の・経済的にも十分な余裕がない所が多く存在する (157-159)。このような地域では現在 WHO をはじめとするさまざまな団体・機関が経済的・技術的支援を行っているが、その一つの方法として、場所を選ばず低コストで運用可能なナノポアシーケンサーを用いた網羅的検出系は、薬剤耐性結核対策の一つの選択肢として有用ではないかと考えている。

#### 第4節 総括

本研究では、遺伝子解析情報を利用し、各種病原体の薬剤耐性の検出ならびに関連性の解析を行った。遺伝子解析を用いる利点は、病原体の培養を必要とせず、培養困難な病原体に対しても利用可能なところである。特に結核菌は培養に特別な設備および長い時間を必要とするため、遺伝子情報の利用を基礎とする本研究のような解析手法は適していると考えられる。近年新たに登場したナノポアシーケンサーは遺伝子解析に必要な機材・コストおよび設備の規模を下げることで期待され、より簡便にシーケンスできるようになり遺伝子情報が身近なものになると考えられる(160, 161)。2019年現在、さらに小型のシーケンス端末や自動サンプル調製機器、小型のオールインワン解析装置なども登場しており、専門技術者以外の医療従事者がシーケンス解析を臨床現場で利用する機会が出てくることが予想される。

一方、遺伝子変異のみで薬剤感受性が必ずしも決められているわけではない点は遺伝子診断手法の臨床応用へ向けた今後の課題である。インフルエンザ菌の研究では、耐性遺伝子型と実際の表現型である MIC との間に乖離がみられる例が少なからず存在した。遺伝子型と表現型との乖離については、どちらが正しいかは不明な点も多い。考えられる乖離の理由として、例えば制御遺伝子の存在、遺伝子発現量の調節機構、バイオフィルムの形成やクオラム・センシングなどが

考えられるが、その解明については、対象領域以外の包括的な解析や、RNA シーケンスが必要となることが予想される(162, 163)。そのため本研究の手法をさらに拡大・発展する必要性があると考えられ、今後の研究課題である。

疫学的な観点からは、遺伝子レベルでの耐性変異がすでに表現型上は感性である菌にも観察されていることから、遺伝子配列情報のモニタリングは今後の耐性菌出現を予測する点において重要である。その場合、簡便にシーケンスできるナノポアシーケンサーは診断のみならず、感染症疫学における有用な解析手法として応用可能ではないかと期待される。



## 参考文献

本研究の内容は、以下を参考とした。

## 第2章

1. 三沢和央、当院で分離された *Haemophilus influenzae* の耐性遺伝子解析、  
第90回感染症学会学術集会（仙台、宮城）、2016年4月16日
2. Misawa K, Tarumoto N, Tamura S, Osa M, Hamamoto T, Yuki A, Kouzaki Y, Imai K, Ronald RL, Yamaguchi T, Murakami T, Maesaki S, Suzuki Y, Kawana A, Maeda T. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding penicillin-binding proteins in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in Japan. BMC Res Notes. 2018 Jan 20;11(1):53. doi: 10.1186/s13104-018-3169-0. PubMed PMID: 29352811; PubMed Central PMCID: PMC5775570.

## 第3章

1. Misawa K, Gene Mutation Analysis of Multiple Drug Resistance tuberculosis by MinION, 3rd Technology Seminar on the MinION sequencing (Manado, Indonesia), 2017.7.5

2. 三沢和央、ナノポアシーケンサーを利用した結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子領域の解析、第 93 回日本感染症学会学術集会（名古屋、愛知）、2019 年 4 月 4 日
3. Misawa K, “Constructing the rapid detection methods of drug-resistance mutation of tuberculosis using mobile nanopore sequencer, MinION” , ECCMID 2019 (Amsterdam, Netherland), 2019.4.14
4. Misawa K., Hamamoto T., Imai K., Tarumoto N., Sakai J., Fujikura Y., Runtuwene LR., Yamagishi J., Suzuki Y., Mitsutake K., Murakami T., Maesaki S., Kawana A., Maeda T. Genotyping of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using multiplex PCR and nanopore sequencing. (in preparation)

## 謝辞

本稿を終えるに当たり、御指導・御高閲を賜りました、防衛医科大学校 国際感染症学講座 宮平靖 博士、防衛医科大学校 小児科学講座 野々山恵章博士ならびに防衛医科大学校 内科学講座（感染症・呼吸器） 川名明彦 博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の実施・遂行並びに論文作成に際して御指導をいただきました埼玉医科大学 微生物学講座 前田卓哉 准教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し多大なご協力をいただきました東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 鈴木穰 教授をはじめ同研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。

本研究で使用した DNA 検体を譲渡いただきました岐阜大学 微生物遺伝資源保存センターに感謝いたします。

## 引用文献

1. MRSA 感染症の治療ガイドライン作成委員会. MRSA 感染症の治療ガイドライン改訂版. 2017.
2. World Health Organization. “Drug-resistant tuberculosis”. World Health Organization. [<https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/en>]. (accessed 2019/06/14).
3. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microbial drug resistance (Larchmont, NY). 2003;9(1):39-46.
4. 坂田宏. 小児臨床分離 *Haemophilus influenzae* の静注用抗菌薬に対する薬剤感受性. 日本化学療法学会雑誌 2009;57:434-7.
5. Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP, Jr., Rauch A. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1997;41(2):292-7.
6. Ishiwada N, Kuroki H, Ishikawa N, Sugimoto K, Koori Y, Suruga Y, et al. Characteristics of  $\beta$ -lactamase-producing and amoxicillin-clavulanate-resistant strains of *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients. Journal of

- Infection and Chemotherapy. 1998;4(3):112-5.
7. Levy SB: From tragedy the antibiotic age is born. The Antibiotic Paradox. Boston, MA:Springer;1992. 1-12.
8. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clinical microbiology reviews. 2011;24(4):718-33.
9. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣議会議. “薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020” . 厚生労働省. 2016 年 4 月 5 日. [<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>]. (2019 年 6 月 14 日閲覧).
10. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical infectious diseases. 2009;49(11):1749-55.
11. 田村俊、池戸正成. MIC 測定の精度上の問題点. 日本化学療法学会雑誌 2011;59:460-8.
12. Lee WB, Fu CY, Chang WH, You HL, Wang CH, Lee MS, et al. A microfluidic device for antimicrobial susceptibility testing based on a broth dilution method. Biosensors & bioelectronics. 2017;87:669-78.
13. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. Lancet (London, England). 2016;387(10014):176-87.
14. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic

- resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*. 2017;9(6):e1403.
15. Waldeisen JR, Wang T, Mitra D, Lee LP. A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis. *PloS one*. 2011;6(12):e28528.
16. van Belkum A, Dunne WM. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(7):2018-24.
17. Su M, Satola SW, Read TD. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(3): e01405-18.
18. Leonard H, Colodner R, Halachmi S, Segal E. Recent advances in the race to design a rapid diagnostic test for antimicrobial resistance. *ACS sensors*. 2018;3(11):2202-17.
19. Nguyen M, Brettin T, Long SW, Musser JM, Olsen RJ, Olson R, et al. Developing an in silico minimum inhibitory concentration panel test for *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific reports*. 2018;8(1):421+. doi:10.1038/s41598-017-18972-w.
20. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(8):2766-70.
21. Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *Journal of human genetics*.

2001;46(8):471-7.

22. Gupta A, Mishra A, Puri N. Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications. *Journal of biotechnology*. 2017;259:148-59.
23. Tamura S, Maeda T, Misawa K, Osa M, Hamamoto T, Yuki A, et al. Development of a highly resolved loop-mediated isothermal amplification method to detect the N526K *ftsI* mutation of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Journal of microbiological methods*. 2017;141:108-14.
24. Jain M, Koren S, Miga KH, Quick J, Rand AC, Sasani TA, et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature biotechnology*. 2018;36:338.
25. 癸生川絵里. Introduction to key concepts in Illumina sequencing data analysis - イルミナシーケンスデータ解析入門その前に. Illumina. 2012. [[https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2012\\_illumina\\_techsupport\\_session5.pdf](https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2012_illumina_techsupport_session5.pdf)]. (2019/6/24 参照).
26. Illumina. Sequencing coverage calculation methods for human whole-genome sequencing technical note. 2014. [<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/hiseq-x-30x-coverage-technical-note-770-2014-042.pdf>]. (accessed in 2019/6/24)
27. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II.

- Error probabilities. Genome research. 1998;8(3):186-94.
28. Illumina. Understanding illumine quality score technical note. 2014.  
[[https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_understanding\\_quality\\_scores.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf)]. (accessed in 2019/6/24)
29. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Smith AL. Characterization of non-beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1984;26(2):235-44.
30. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clinical microbiology reviews. 2007;20(2):368-89.
31. Skaare D, Anthonisen IL, Caugant DA, Jenkins A, Steinbakk M, Strand L, et al. Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. BMC microbiology. 2014; 14:131.
32. Shiro H, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2000-2001, 2004, 2007, 2010, and 2012: evaluation of the changes in drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* and patients' background factors. Journal of infection and chemotherapy. 2015;21(4):247-56.



33. Bae S, Lee J, Lee J, Kim E, Lee S, Yu J, et al. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):65-71.
34. Kim IS, Ki CS, Kim S, Oh WS, Peck KR, Song JH, et al. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus influenzae* strains isolated in Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(2):453-60.
35. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1693-9.
36. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial drug resistance* (Larchmont, NY). 2003;9(1):39-46.
37. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents*

- and chemotherapy. 2002;46(7):2208-18.
38. Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Kataoka H, Suzuki T, Maeda K, et al. Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* beta-lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(7):2834-9.
39. L  m TT, Claus H, Elias J, Frosch M, Vogel U. Ampicillin resistance of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2009-2012. International journal of medical microbiology. 2015;305(7):748-55.
40. Garcia LS. Clinical microbiology procedures handbook. 3rd ed. Washington DC, USA:ASM Press, 2010.
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement M100-S25. Wayne, PA:NCCLS;2015.
42. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics (Oxford, England). 2009;25(14):1754-60.
43. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics (Oxford, England). 2009;25(16):2078-9.

44. Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. Journal of clinical microbiology. 2012;50(4):1422-4.
45. Nørskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. Journal of bacteriology. 2009;191(3):822-31.
46. McCrea KW, Xie J, LaCross N, Patel M, Mukundan D, Murphy TF, et al. Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. Journal of clinical microbiology. 2008;46(2):406-16.
47. Binks MJ, Temple B, Kirkham LA, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, et al. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. PloS one. 2012;7(3): e34083.
48. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of *Haemophilus influenzae*. Journal of clinical microbiology. 2007;45(7):2305-8.
49. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin.

- Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(5):1630–9.
50. Sanchez L, Pan W, Vinas M, Nikaido H. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. Journal of bacteriology. 1997;179(21):6855–7.
51. Dean CR, Narayan S, Daigle DM, Dzink-Fox JL, Puyang X, Bracken KR, et al. Role of the *AcrAB-TolC* efflux pump in determining susceptibility of *Haemophilus influenzae* to the novel peptide deformylase inhibitor LBM415. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(8):3129–35.
52. Trepod CM, Mott JE. Identification of the *Haemophilus influenzae tolC* gene by susceptibility profiles of insertionally inactivated efflux pump mutants. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(4):1416–8.
53. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution. 2016;33(7):1870–4.
54. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. Nature biotechnology. 2011;29(1):24–6.
55. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in bioinformatics. 2013;14(2):178–92.

56. Millard SP. EnvStats: An R package for environmental statistics. Springer, New York. 2013. ISBN 978-1-4614-8455-4.
57. Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(11):3969-76.
58. Witherden EA, Bajanca-Lavado MP, Tristram SG, Nunes A. Role of inter-species recombination of the *ftsI* gene in the dissemination of altered penicillin-binding-protein-3-mediated resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(6):1501-9.
59. Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. Journal of infection and chemotherapy. 2013;19(1):34-41.
60. Anderson R, Wang X, Briere EC, Katz LS, Cohn AC, Clark TA, et al. *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease. Journal of clinical microbiology. 2012;50(7):2462-5.
61. Price EP, Sarovich DS, Nosworthy E, Beissbarth J, Marsh RL, Pickering J, et al.

- Haemophilus influenzae*: using comparative genomics to accurately identify a highly recombinogenic human pathogen. BMC genomics. 2015; 16:641.
62. de Gier C, Kirkham LA, Nørskov-Lauritsen N. Complete deletion of the fucose operon in *Haemophilus influenzae* is associated with a cluster in multilocus sequence analysis-based phylogenetic group II related to *Haemophilus haemolyticus*: Implications for identification and typing. Journal of clinical microbiology. 2015;53(12):3773-8.
63. Witherden EA, Tristram SG. Prevalence and mechanisms of beta-lactam resistance in *Haemophilus haemolyticus*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2013;68(5):1049-53.
64. Brown DF, Reynolds PE. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEBS letters. 1980;122(2):275-8.
65. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology. 1984;158(2):513-6.
66. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1985;28(3):397-403.
67. Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Occurrence of a beta-lactam-inducible

penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci.

Antimicrobial agents and chemotherapy. 1985;27(5):851-7.

68. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology. 1986;167(3):975-80.

69. Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). FEBS letters. 1992;298(2-3):133-6.

70. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1992;36(1):25-31.

71. Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1996;40(12):2680-5.

72. Weller TM. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to

- methicillin. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 1999;43(1):15-22.
73. Hiramatsu K. Molecular evolution of MRSA. Microbiology and immunology. 1995;39(8):531-43.
74. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Infection & chemotherapy. 2013;45(2):117-36.
75. Ecker A, Lehane AM, Clain J, Fidock DA. PfcRT and its role in antimalarial drug resistance. Trends in parasitology. 2012;28(11):504-14.
76. 吉山崇. 多剤耐性結核への対策. 結核. 2013;88(11):749-56.
77. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis--time for a game change. The New England journal of medicine. 2010;363(11):1070-1.
78. Kendall EA, Cohen T, Mitnick CD, Dowdy DW. Second line drug susceptibility testing to inform the treatment of rifampin-resistant tuberculosis: a quantitative perspective. International journal of infectious diseases. 2017;56:185-9.
79. Iseman MD. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. The New England journal of medicine. 1993;329(11):784-91.
80. Günther G, Lange C, Alexandru S, Altet N, Avsar K, Bang D, et al. Treatment outcomes in multidrug-resistant tuberculosis. The New England journal of



medicine. 2016;375(11):1103-5.

81. 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会. 抗酸菌検査ガイド 2016. 東京:南江堂;2016.
82. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Del Ojo Elias C, Bradley P, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. The Lancet infectious diseases. 2015;15(10):1193-202.
83. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. The New England journal of medicine. 2010;363(11):1005-15.
84. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert<sup>(R)</sup> MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. The Cochrane database of systematic reviews. 2014(1): Cd009593.
85. Siu GK, Zhang Y, Lau TC, Lau RW, Ho PL, Yew WW, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(4):730-3.
86. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E, et al. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. Journal of clinical microbiology.

2011;49(7):2688–90.

87. Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Maxeiner H, Balabanova Y, Casali N, Kontsevaya I, et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. *BMC medicine*. 2013; 11:190. doi:10.1186/1741-7015-11-190.
88. Weyer K, Mirzayev F, Migliori GB, Van Gemert W, D'Ambrosio L, Zignol M, et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. *The European respiratory journal*. 2013;42(1):252–71.
89. Aubry A, Sougakoff W, Bodzongo P, Delcroix G, Armand S, Millot G, et al. First evaluation of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Congo revealed misdetection of fluoroquinolone resistance by line probe assay due to a double substitution T80A–A90G in GyrA. *PloS one*. 2014;9(4): e95083.
90. Rufai SB, Kumar P, Singh A, Prajapati S, Balooni V, Singh S. Comparison of Xpert MTB/RIF with line probe assay for detection of rifampin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):1846–52.
91. Eddabra R, Ait Benhassou H. Rapid molecular assays for detection of tuberculosis. *Pneumonia (Nathan, Qld, Australia)*. 2018; 10:4.
92. Global laboratory initiative working group. “Line probe assays for drug-resis

- tant tuberculosis detection.” World Health Organization. [[http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/LPA\\_test\\_web\\_ready.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/LPA_test_web_ready.pdf)]. (accessed 2019/6/15)
93. Cornelis S, Gansemans Y, Deleye L, Deforce D, Van Nieuwerburgh F. Forensic SNP genotyping using nanopore MinION sequencing. *Scientific reports*. 2017;7:41759. doi: 10.1038/srep41759.
  94. Imai K, Tamura K, Tanigaki T, Takizawa M, Nakayama E, Taniguchi T, et al. Whole genome sequencing of influenza A and B viruses with the MinION sequencer in the clinical setting: A pilot study. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2748. doi:10.3389/fmicb.2018.02748. eCollection 2018.
  95. Lang K, Surendranath V, Quenzel P, Schofl G, Schmidt AH, Lange V. Full-length HLA class I genotyping with the MinION nanopore sequencer. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2018;1802:155–62.
  96. Runtuwene LR, Tuda JSB, Mongan AE, Makalowski W, Frith MC, Imwong M, et al. Nanopore sequencing of drug-resistance-associated genes in malaria parasites, *Plasmodium falciparum*. *Scientific reports*. 2018;8(1):8286. doi: 10.1038/s41598-018-26334-3.
  97. Wang J, Moore NE, Deng YM, Eccles DA, Hall RJ. MinION nanopore sequencing of a n influenza genome. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:766. doi: 10.3389/fmicb.2015.00766. eCollection 2015.

98. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature protocols*. 2017;12(6):1261–76.
99. Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, Fischer RJ, Hoenen A, Judson SD, et al. Nanopore Sequencing as a Rapidly Deployable Ebola Outbreak Tool. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(2):331–4.
100. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, Del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, et al. Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole-genome sequencing of direct respiratory samples. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(5):1285–98.
101. Doyle RM, Burgess C, Williams R, Gorton R, Booth H, Brown J, et al. Direct whole-genome sequencing of sputum accurately identifies drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* faster than MGIT culture sequencing. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(8). pii e00666–18. doi:10.1128/JCM.00666–18.
102. Colman RE, Anderson J, Lemmer D, Lehmkuhl E, Georghiou SB, Heaton H, et al. Rapid drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples by use of amplicon sequencing: a proof-of-concept study. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(8):2058–67.
103. Colman RE, Schupp JM, Hicks ND, Smith DE, Buchhagen JL, Valafar F, et al.

- Detection of low-level mixed-population drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using high fidelity amplicon sequencing. PloS one. 2015;10(5):e0126626. doi:10.1371/journal.pone.0126626. eCollection 2015.
104. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. The journal of antimicrobial chemotherapy. 2011;66(7):1417-30.
105. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(5):2032-41.
106. Cuevas-Cordoba B, Juarez-Eusebio DM, Almaraz-Velasco R, Muniz-Salazar R, Laniado-Laborin R, Zenteno-Cuevas R. Mutation at *embB* codon 306, a potential marker for the identification of multidrug resistance associated with ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(9):5455-62.
107. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. The journal of

- antimicrobial chemotherapy. 2018;73(5):1138–51.
108. Feuerriegel S, Koser CU, Niemann S. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(5):1205–10.
109. Gopal P, Tasneen R, Yee M, Lanoix JP, Sarathy J, Rasic G, et al. *In vivo*-selected pyrazinoic acid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains harbor missense mutations in the aspartate decarboxylase PanD and the unfoldase ClpC1. ACS infectious diseases. 2017;3(7):492–501.
110. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. FEMS microbiology reviews. 2017;41(3):354–73.
111. Hameed HMA, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, et al. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018; 8:114. doi:10.3389/fcimb.2018.00114. eCollection 2018.
112. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(5):1852–4.
113. Kar NP, Sikriwal D, Rath P, Choudhary RK, Batra JK. *Mycobacterium tuberculosis*

- ClpC1: characterization and role of the N-terminal domain in its function. The FEBS journal. 2008;275(24):6149–58.
114. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. Advances in medical sciences. 2016;61(1):63–71.
115. Plinke C, Walter K, Aly S, Ehlers S, Niemann S. *Mycobacterium tuberculosis embB* codon 306 mutations confer moderately increased resistance to ethambutol *in vitro* and *in vivo*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(6):2891–6.
116. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tubercle and lung disease. 1998;79(1):3–29.
117. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology. 2007;45(1):179–92.
118. Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(10):5186–93.
119. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated

- detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993;37(10):2054-8.
120. Yee M, Gopal P, Dick T. Missense mutations in the unfoldase ClpC1 of the caseinolytic protease complex are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017;61(2). pii: e02342-16. doi:10.1128/AAC.02342-16.
121. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. The international journal of tuberculosis and lung disease. 2015;19(11):1276-89.
122. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome research. 2010;20(9):1297-303.
123. Loman NJ, Quinlan AR. Poretools: A toolkit for analyzing nanopore sequence data. Bioinformatics (Oxford, England). 2014;30(23):3399-401.
124. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Bioinformatics (Oxford, England). 2018;34(15):2666-9.
125. Sovic I, Sikic M, Wilm A, Fenlon SN, Chen S, Nagarajan N. Fast and sensitive



- mapping of nanopore sequencing reads with GraphMap. *Nature communications*. 2016; 7:11307.
126. Shen W, Le S, Li Y, Hu F. SeqKit: A Cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PloS One*. 2016;11(10): e0163962. doi: 10.1371/journal.pone.0163962. eCollection 2016.
127. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004;32(5):1792-7.
128. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(6):443-51.
129. Olson ND, Lund SP, Colman RE, Foster JT, Sahl JW, Schupp JM, et al. Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics. *Frontiers in genetics*. 2015;6:235. doi: 10.3389/fgene.2015.00235. eCollection 2015.
130. Sebastian Schmeire. “Computational Genomics Tutorial. 7. Variant calling. Release 2019.03.” [[https://genomics.sschmeier.com/\\_downloads/0930752cfceffb98bc5fbc5d54dbd4bc/Genomics.pdf](https://genomics.sschmeier.com/_downloads/0930752cfceffb98bc5fbc5d54dbd4bc/Genomics.pdf)]. (Accessed in 2019/8/5).
131. Oxford Nanopore Technology. Product brochure. 2019. [<https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/literature/Product%20Brochure%202019.pdf>]. (accessed in 2019/6/25).

132. Boza V, Brejova B, Vinar T. DeepNano: Deep recurrent neural networks for base calling in MinION nanopore reads. *PloS one*. 2017;12(6):e0178751.
133. David M, Dursi LJ, Yao D, Boutros PC, Simpson JT. Nanocall: an open source basecaller for Oxford Nanopore sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2017;33(1):49–55.
134. Teng H, Cao MD, Hall MB, Duarte T, Wang S, Coin LJM. Chiron: translating nanopore raw signal directly into nucleotide sequence using deep learning. *GigaScience*. 2018;7(5).
135. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic acids research*. 1997;25(16):3235–41.
136. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic acids research*. 1992;20(7):1717–23.
137. Porreca GJ, Zhang K, Li JB, Xie B, Austin D, Vassallo SL, et al. Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nature methods*. 2007;4(11):931–6.
138. Puskas LG, Bottka S. Reduction of mispriming in amplification reactions with restricted PCR. *Genome research*. 1995;5(3):309–11.
139. Shigemori Y, Mikawa T, Shibata T, Oishi M. Multiplex PCR: use of heat-stable

- Thermus thermophilus RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic acids research*. 2005;33(14):e126.
140. Shum J, Paul N. Chemically modified primers for improved multiplex polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009;388(2):266–72.
141. Lindberg MR, Schmedes SE, Hewitt FC, Haas JL, Ternus KL, Kadavy DR, et al. A Comparison and Integration of MiSeq and MinION Platforms for Sequencing Single Source and Mixed Mitochondrial Genomes. *PloS one*. 2016;11(12):e0167600. doi: 10.1371/journal.pone.0167600.
142. Tyler AD, Mataseje L, Urfano CJ, Schmidt L, Antonation KS, Mulvey MR, et al. Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications. *Scientific reports*. 2018;8(1):10931. doi: 10.1038/s41598-018-29334-5.
143. Mikheyev AS, Tin MMY. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular ecology resources*. 2014;14(6):1097–102.
144. Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, D'Aurizio R. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Briefings in bioinformatics*. 2018;19(6):1256–72.
145. Sarkozy P, Jobbágy Á, Antal P. Calling Homopolymer Stretches from Raw Nanopore Reads by Analyzing k-mer Dwell Times. *IFMBE Proceedings [Internet]*. Springer

Singapore; 2017 Jun 13;241-4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-5122-7\\_61](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-5122-7_61) (Accessed 2019/5/31)

146. Luo R, Sedlazeck FJ, Lam TW, Schatz MC. A multi-task convolutional deep neural network for variant calling in single molecule sequencing. *Nature communications*. 2019;10(1):998.
147. Hao X, Chen T. OTU analysis using metagenomic shotgun sequencing data. *PloS one*. 2012;7(11) e49785. doi:10.1371/journal.pone.0049785.
148. Beye M, Fahsi N, Raoult D, Fournier PE. Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New microbes and new infections*. 2018;22:24-9.
149. Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014;64(Pt 2):346-51.
150. Nag S, Kofoed PE, Ursing J, Lemvigh CK, Allesoe RL, Rodrigues A, et al. Direct whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* specimens from dried erythrocyte spots. *Malaria journal*. 2018;17(1):91.
151. Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, Dafaie F, Richter E, Rusch-Gerdes S, et al. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in

- Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting. BMC microbiology. 2012;12:90. doi:10.1186/1471-2180-12-90.
152. Lau RW, Ho PL, Kao RY, Yew WW, Lau TC, Cheng VC, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of *gyrA* mutation at position 74. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(2):608-14.
153. Miotto P, Cirillo DM, Migliori GB. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness. Chest. 2015;147(4):1135-43.
154. Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, et al. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* *gidB* gene. Journal of clinical microbiology. 2011;49(7):2625-30.
155. Villellas C, Aristimuno L, Vitoria MA, Prat C, Blanco S, Garcia de Viedma D, et al. Analysis of mutations in streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. Journal of clinical microbiology. 2013;51(7):2124-30.
156. World Health Organization. “Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) 2017 update” . World Health Organization. [[https://www.who.int/tb/challenges/mdr/MDR-RR\\_TB\\_factsheet\\_2017.pdf](https://www.who.int/tb/challenges/mdr/MDR-RR_TB_factsheet_2017.pdf)]. (accessed 2019/07/23).

157. 独立行政法人 国際協力機構. 「結核対策プロジェクト (インドネシア)」  
[<https://www.jica.go.jp/project/indonesia/007/outline/index.html>] (2019 年 7 月  
23 日閲覧).
158. 森井徹. 「三大感染症の今 インドネシアの挑戦 (中) 都市に潜む結核の脅威」. 西  
日本新聞 2018 年 12 月 25 日朝刊. [<https://www.nishinippon.co.jp/item/n/475984/>].  
(2019 年 7 月 23 日閲覧).
159. 平田雄介. 「風邪か呪いか…見過ごされるインドネシア結核患者たち」. 産経新聞 2018  
年 12 月 17 日. [<https://www.sankei.com/world/news/181217/wor1812170017-n1.html>].  
(2019 年 7 月 23 日閲覧).
160. Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, Stahl SE, Rubins KH, McIntyre ABR, et al.  
Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station.  
Scientific reports. 2017;7(1):18022. doi: 10.1038/s41598-017-18364-0.
161. Goordial J, Altshuler I, Hindson K, Chan-Yam K, Marcoletas E, Whyte LG. In  
Situ Field Sequencing and Life Detection in Remote (79 degrees 26' N) Canadian  
High Arctic Permafrost Ice Wedge Microbial Communities. Frontiers in  
microbiology. 2017;8:2594. doi: 10.3389/fmicb.2017.02594. eCollection 2017.
162. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance  
and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS microbiology reviews. 2017;41(3):276-  
301.

163. Yan F, Yu Y, Gozzi K, Chen Y, Guo JH, Chai Y. Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology. 2017;83(13). pii:e00561-17. doi:10.1128/AEM.00561-17.

図・表



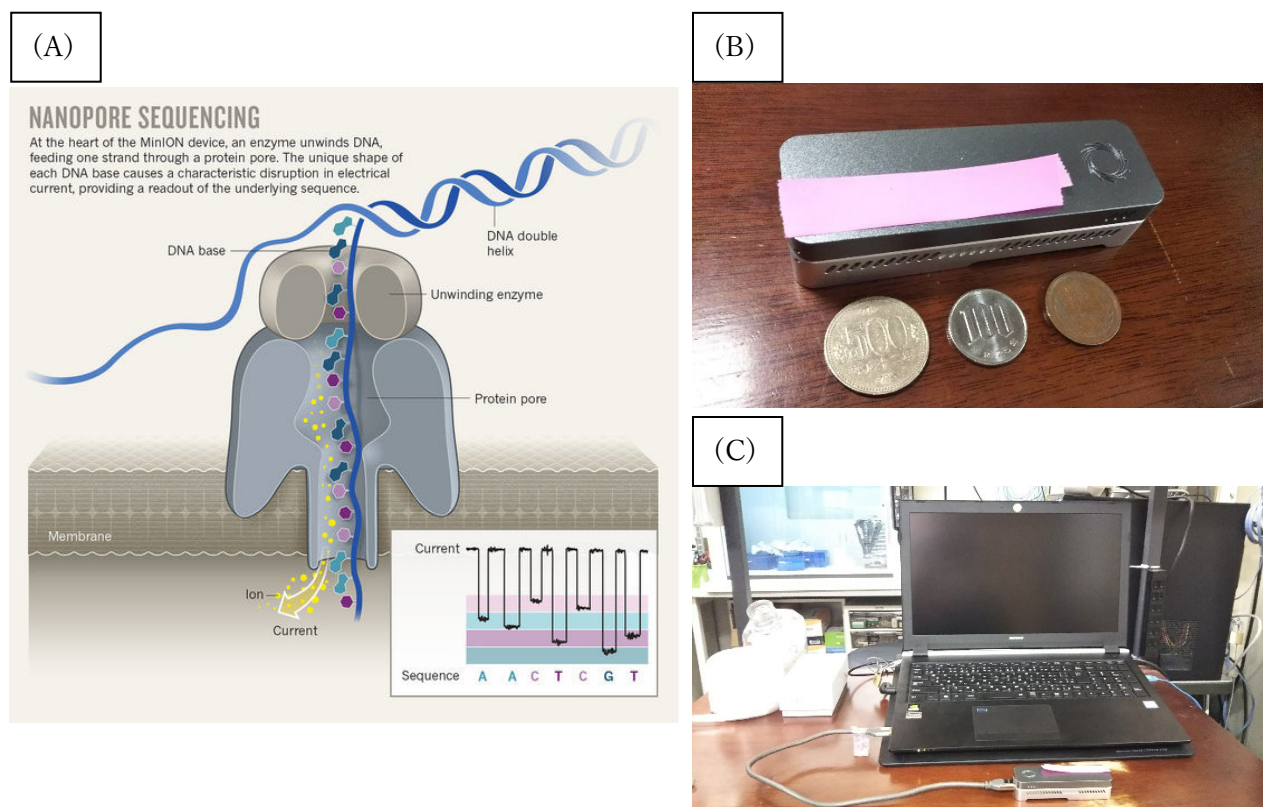


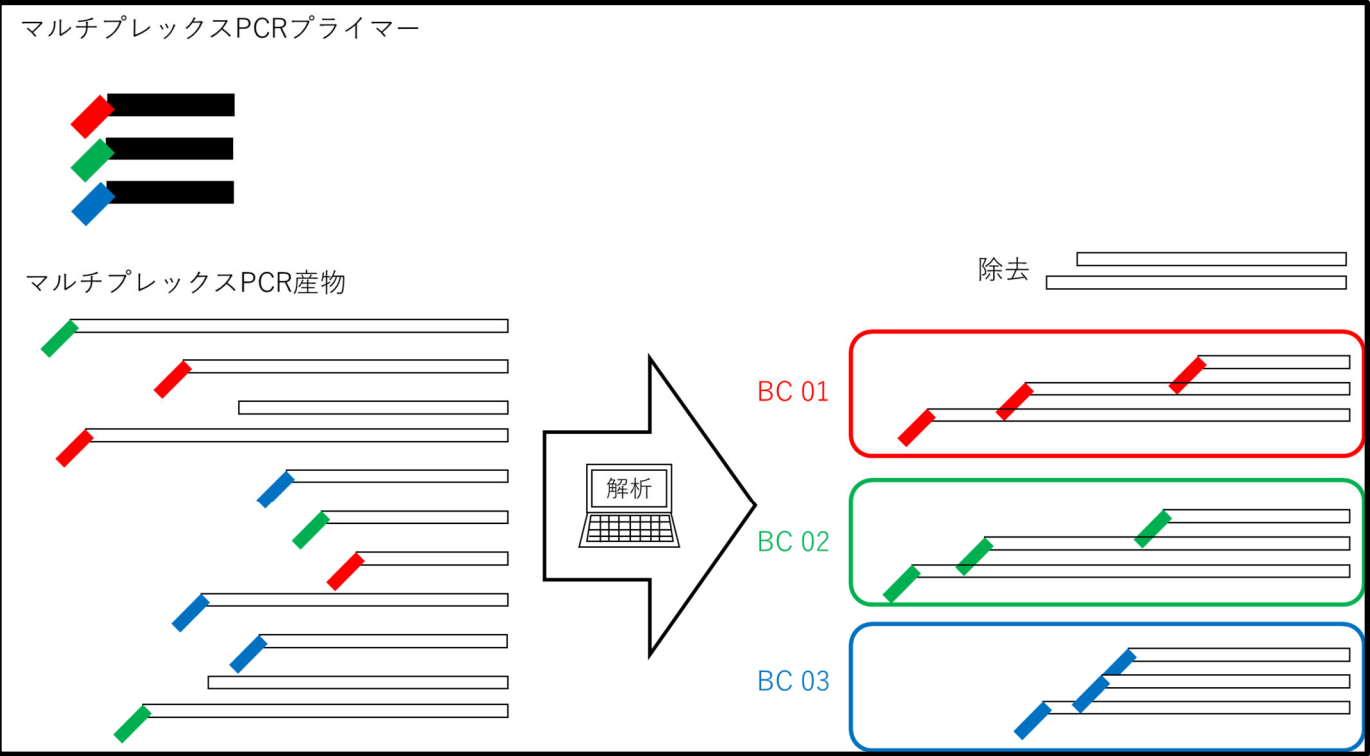
図 1

ナノポアシーケンサーMinION™ (Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK)

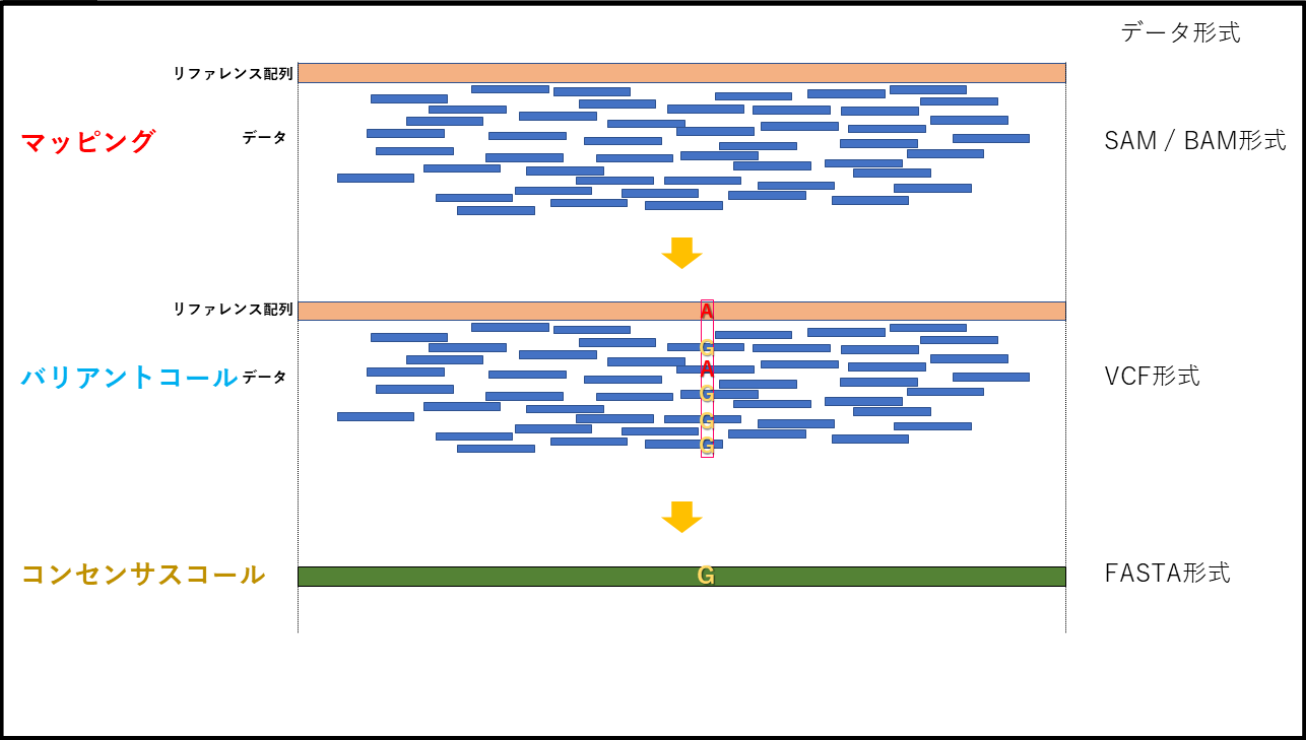
- (A) シークエンスのメカニズム。ナノスケールの孔を DNA 鎖が通過する際の電流の変化より塩基情報を取得する。<http://blogs.nature.com/naturejobs/2017/10/16/techblog-the-nanopore-toolbox/> より引用、2019 年 5 月 29 日参照)
- (B) シーケンサー本体、大きさは約 100×33×23mm。比較のため硬貨を並置する。
- (C) 実際のシークエンス風景。USB 3.0 で市販のコンピュータと接続し、専用のソフトウェアを用いて制御・解析を行う。写真では Windows を利用しているが、Mac、Linux にも対応している。

図 2

(A)



(B)



## 図 2

NGS のデータ解析に関する概念図（各用語の詳細な説明は本文中の \* 1 を参照）

### (A) デマルチプレックス

青、緑、青の線は各バーコード配列を示す。各リードのバーコード配列をコンピュータ上で認識し、それぞれのデータに振り分ける。バーコードのない、または正しく認識されないリードは除去される。

### (B) マッピング（アライメント）、バリエーションコールおよびコンセンサスコール

各データをリファレンス配列と照らし合わせ、どの部分に相当するかを確認する。そして、それぞれの塩基部位における変異を検索する。検出した変異部位をリファレンス配列に当てはめることで、各サンプルの塩基配列が最終的に求まる。

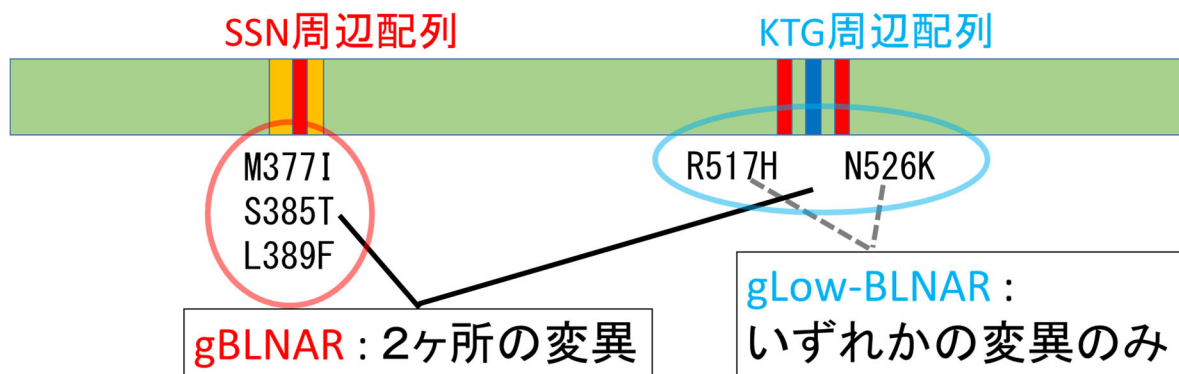


図 3

BLNAR 型インフルエンザ菌の耐性機序。 *fts-I* 遺伝子の KTG 周辺配列にのみ変異の入るものは比較的 MIC が低い gLow-BLNAR（本文中の group I / II に相当）に当たり、加えて SSN 周辺配列に変異が加わると gBLNAR（本文中の group III に相当）となり MIC が大きく上昇するとされる。（生方公子ら，日本化学療法学会雑誌，2006; 54: 69-94 より一部改変）

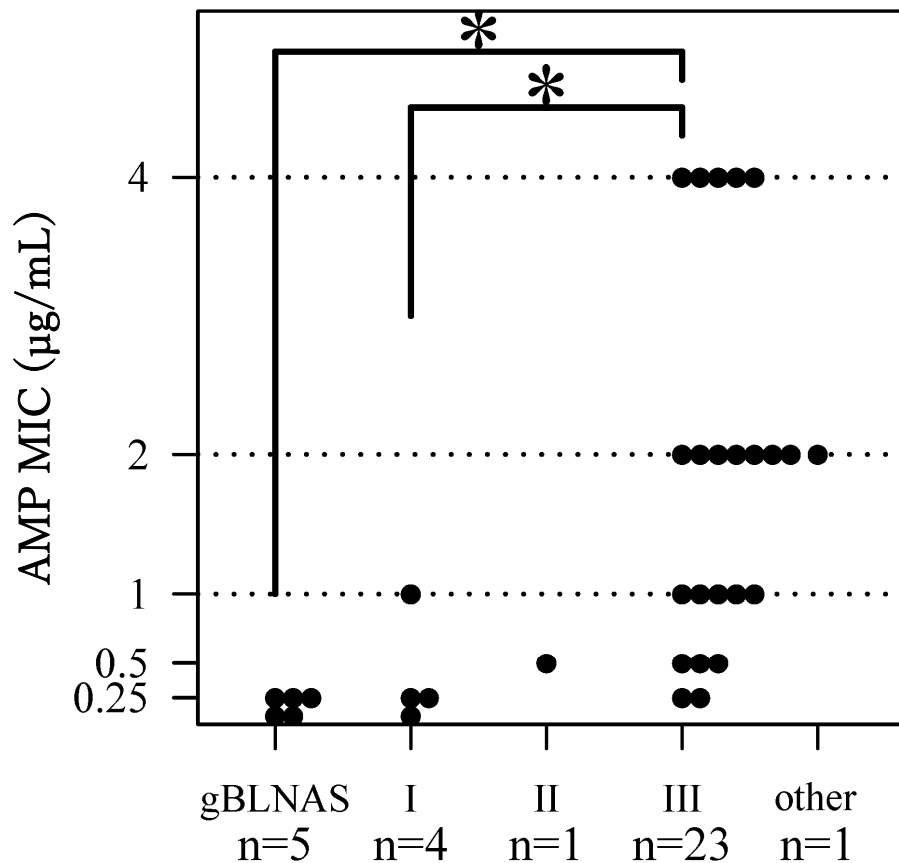


図 4

$\beta$  ラクタマーゼ非産生株における遺伝子型 (genotype group) と AMP の MIC との関係 (n=34)。\* : t 検定において  $p < 0.05$ 。

gBLNAS : SSN,KTG 両領域に遺伝子変異を認めないもの。

gBLNAR I : KTG 領域の N526K を有する。

gBLNAR II : KTG 領域の R517H を有する。

gBLNAR III : SSN 領域のいずれか 1 つ以上 (M377I、S385T および L389F) かつ KTG 領域のいずれかを有する。

Other : 上記の基準以外 (n=1 : SSN 周辺配列のみの変異)

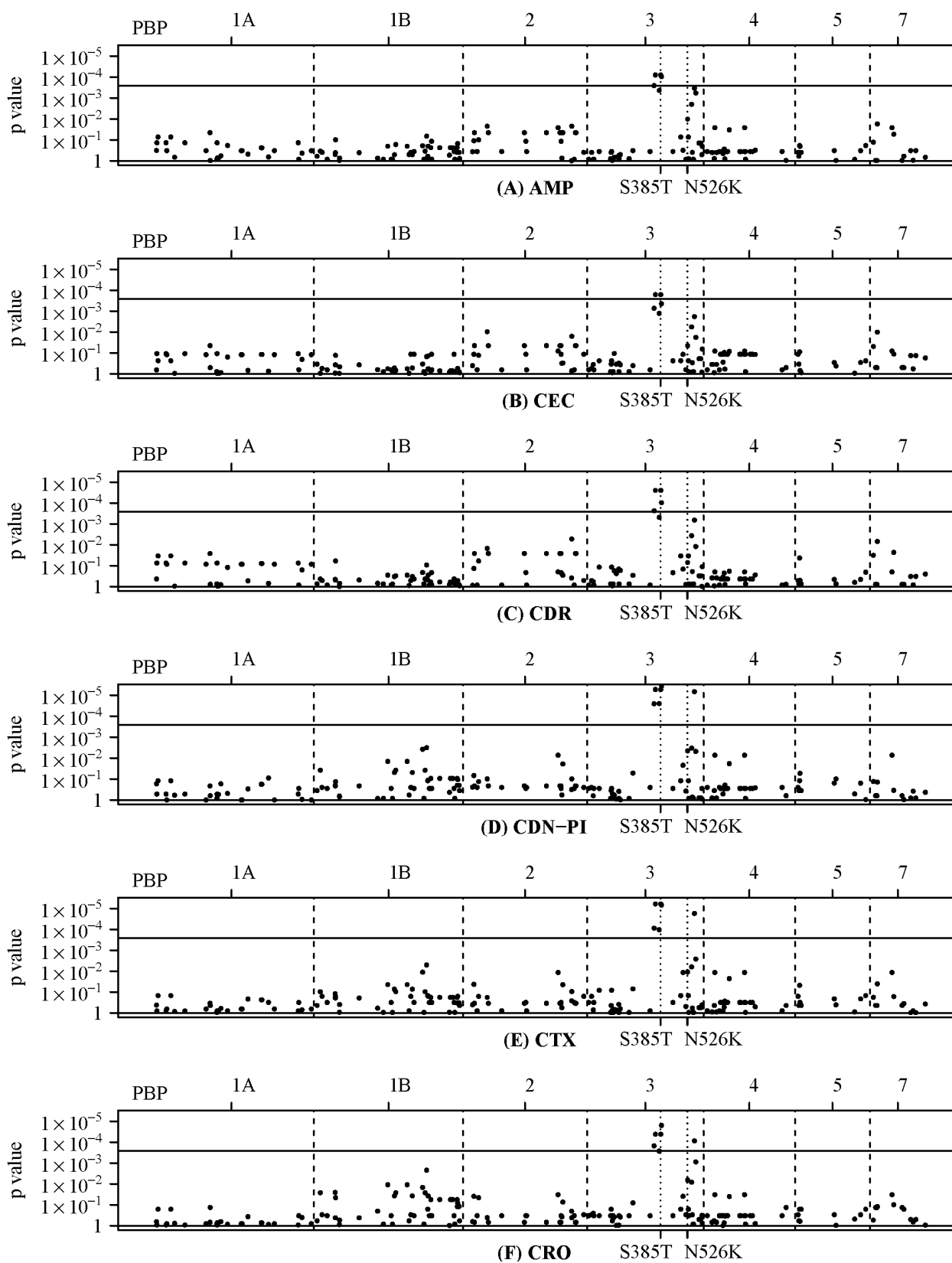


図 5

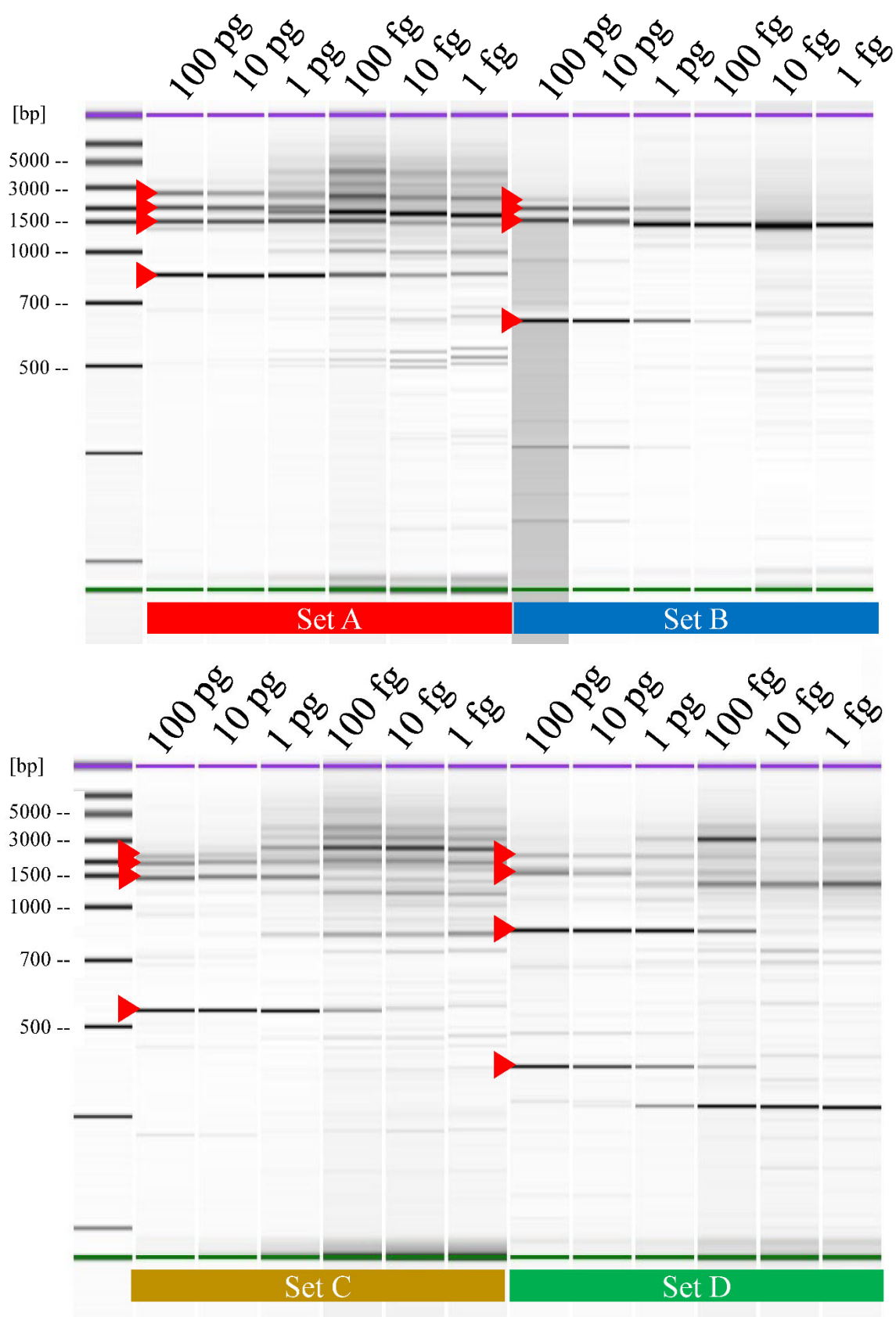
$\beta$  ラクタマーゼ非産生 *H. influenzae* 株の PBP（ペニシリン結合蛋白質）をコードする全 7 領域における各 SNP とペニシリン系・セフェム系の MIC との相関。

対象菌株は  $\beta$  ラクタマーゼ非産生 *H. influenzae* 全 34 株のうち、塩基配列の決定により明確に *H. influenzae* と判定できなかった 2 株、およびデータ量の不足から PBP 全 7 領域の全長を決定できなかった 5 株を除外した全 27 株を対象とした。アミノ酸変異を伴う全 190 か所の SNP 毎に変異あり・変異なし群の MIC に対して Mann-Whitney 検定を行い p 値を算出した。横軸が SNP の部位、縦軸が p 値、水平方向の実線は有意水準を表す。有意水準には Bonferroni 補正を用い、0.05 を non-synonymous SNP の総数である 190 で除した値を使用した。SSN、KTG 領域の代表的な変異部位（S385T, N526K）を点線で示す。

各抗菌薬の名称は以下の通り。

- (A) アンピシリン (AMP) . . .  $\beta$  ラクタム系
- (B) セファクロル (CEC) . . . 第 1 世代セフェム系
- (C) セフジニル(CDR) . . . 第 3 世代セフェム系
- (D) セフジトレンピボキシル (CDN-PI) . . . 第 3 世代セフェム系
- (E) セフォタキシム (CTX) . . . 第 3 世代セフェム系
- (F) セフトリアキソン(CRO) . . . 第 3 世代セフェム系

Figure 6





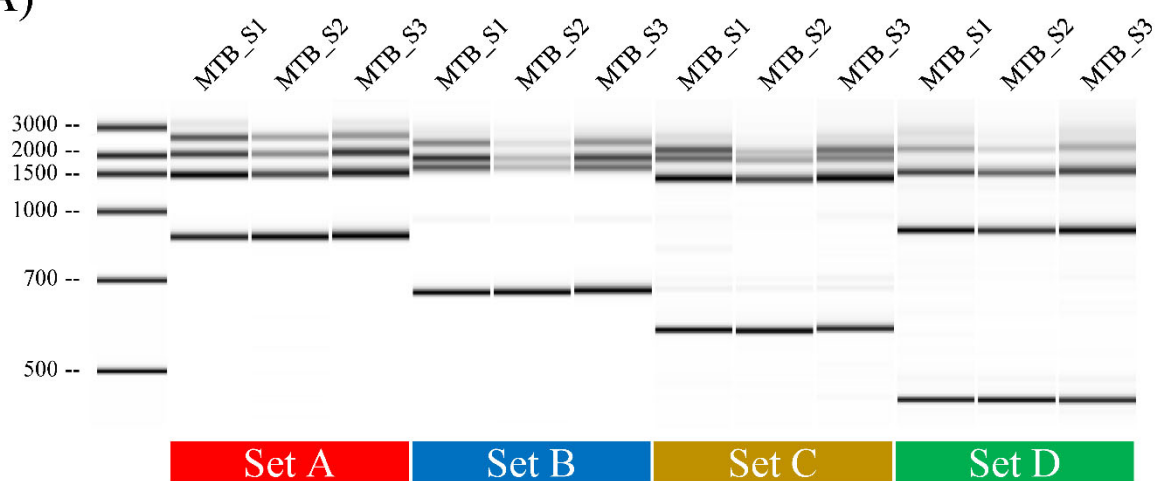
## 図 6

マルチプレックス PCR におけるサンプル DNA 量の決定。Bioanalyzer 2100 および DNA 7500 kit を用いて解析したゲルイメージによる結果。サンプルには各 DNA 濃度に希釈した *M. bovis* DNA を使用した。各泳動の上に DNA 濃度、図下方の Set A~D は表 6 のプライマーセット名にそれぞれ対応する。赤矢頭が目的の DNA 産物を示す。

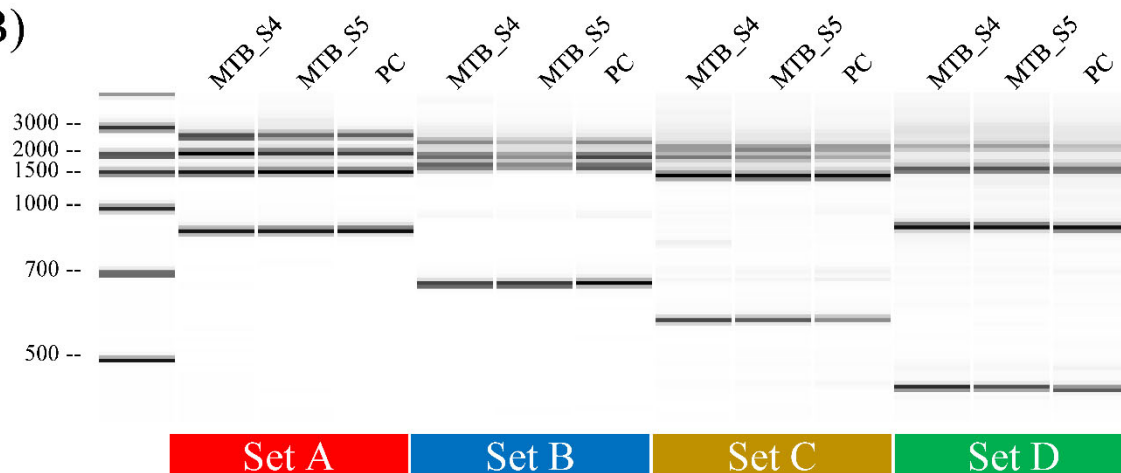
この結果、10 pg の DNA 量を使用した際に目的とする 4 本の DNA バンドが明確に観察出来るという事が示され、加えて 10 pg までの DNA 使用条件で非特異的なバンドの増幅が最小限に抑えられることも明らかになった。

以後の解析では、この結果を参考に 1 反応チューブあたり 10 pg の DNA 量を以降の反応条件として決定した。

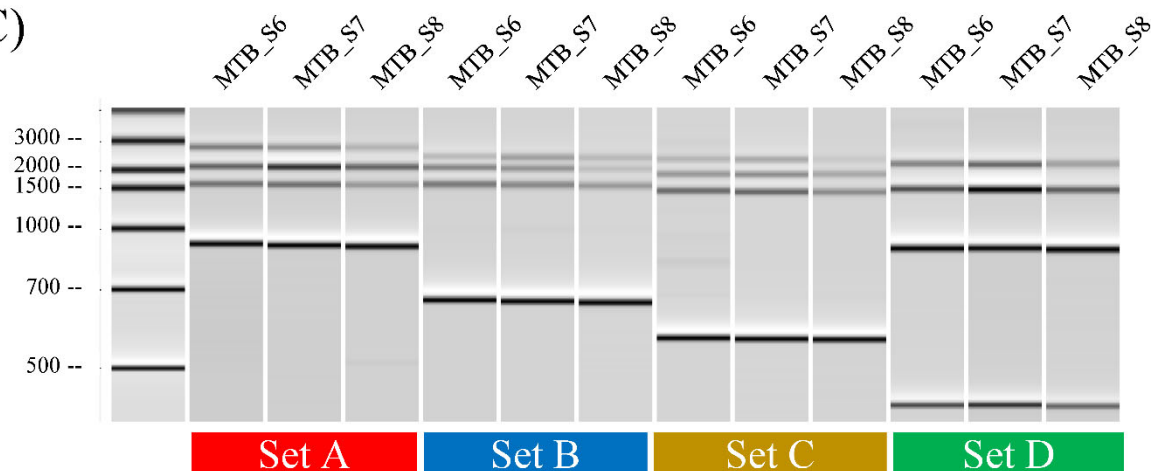
(A)



(B)



(C)



## 図 7

結核菌のマルチプレックス PCR の泳動結果。Bioanalyzer 2100 および DNA 7500 で解析を行ったゲルイメージ結果。左端の Ladder の単位はすべて bp。

(A) Run1 (MDRTB1, MDRTB2 および MDRTB3)

(B) Run2 (NDMCTB1, NDMCTB5) および陽性対照 (PC: Positive Control, *M. bovis* DNA)。

(C) Run3 (NDMCTB2, NDMCTB3 および NDMCTB4)

図上方のサンプル名は表 5 のサンプル名に、図下方の Set A~D は表 6 のプライマーセット名にそれぞれ対応する。各反応チューブの DNA 濃度は事前の *M. bovis* DNA を用いた検証を参考に 1 反応チューブ当たり 10 pg を使用した。バンドの視認がしやすいように対象領域のレンジを拡大している。

ゲルイメージからは、PC を含むすべての反応チューブにおいて、目的の 4 本のバンドが確認できた。

図 8

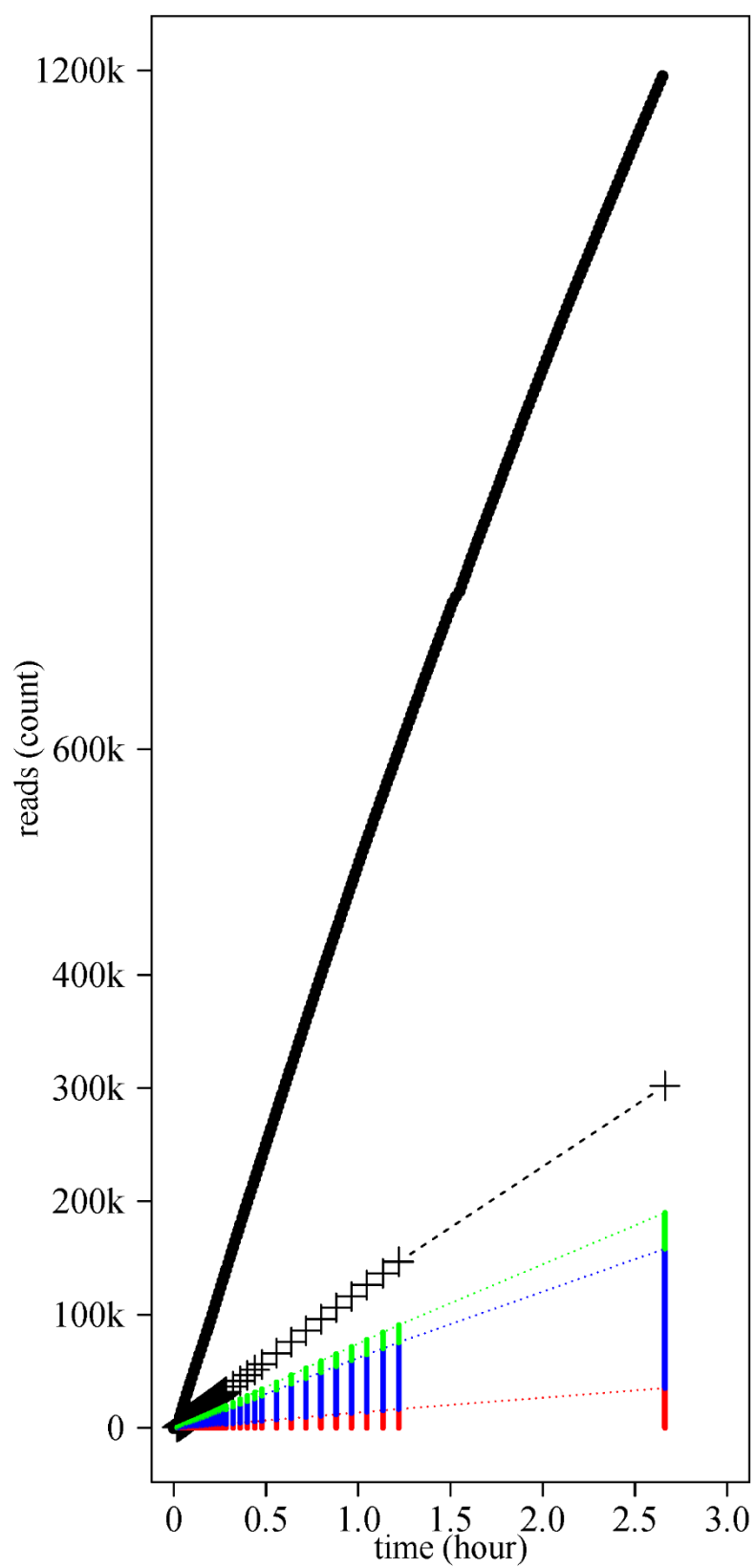


図 8

Run1 におけるシーケンス時間と出力されるデータ量との関連。横軸がシーケンス時間（サンプルをフローセルに入れて解析を開始してからの時間）、縦軸がリード数を示す。

各グラフの内容は以下のとおりである。

・ 黒線 はリアルタイムで FAST5 形式により出力される元データのリード数を示す。

・ 黒+ は  $1\text{ D}^2$  ベースコール時のリード数を示す。

・ 赤・青・緑の棒線 は、それぞれデマルチプレックスした際の MDRTB1、MDRTB2 および MDRTB3 のリード数を表す。

この結果からは  $1\text{ D}^2$  ベースコールにより、元のデータ量より減少すること、さらにデマルチプレックスによりデータが減少することがわかる。1 サンプル当たり 60 k、100 k および 400 k のデータ量を取得できたシーケンス時間はそれぞれ 22 分、36 分および 2.6 時間であった。

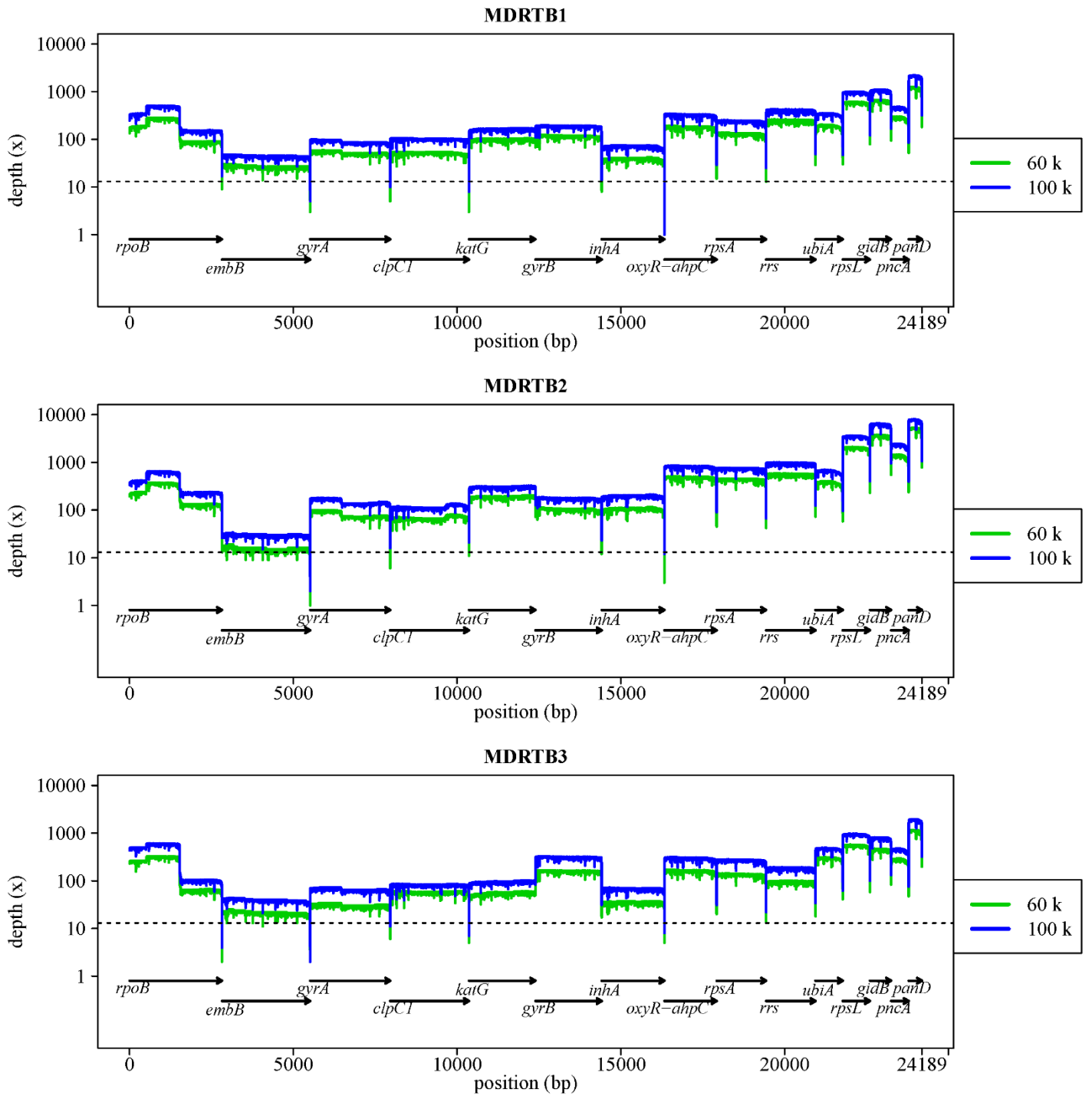


図 9

Run1 におけるリファレンスに対するカバレッジの全体像。横軸がリファレンスの長さ、縦軸がカバレッジ（デプス）を示す。グラフ下方にリファレンスにおける遺伝子領域部位を示す。

60 k および 100 k のデータ量の結果のみ図示。水平方向のダッシュ線はカバレッジ 13 x（論理的なカットオフ）を示す。これは平均クオリティスコアより算出した、リファレンス全長において、すべての部位で正しい塩基が誤った塩基を上回ると推定されるカバレッジを表す。本研究ではベースコール後の平均クオリティスコアが約 6 であることから、論理的なカットオフを 13 x と概算した。

基本的にデータ量の増加に伴いカバレッジは増加していく。60 k では 3 サンプルの平均カバレッジの最低値が約 15 x となり、論理的なカットオフを上回るものの、一部の塩基部位ではカットオフを下回っていることがわかる。100 k まで使用データ量を増加することで、ほぼすべての塩基部位のカバレッジが 13x を超えた。

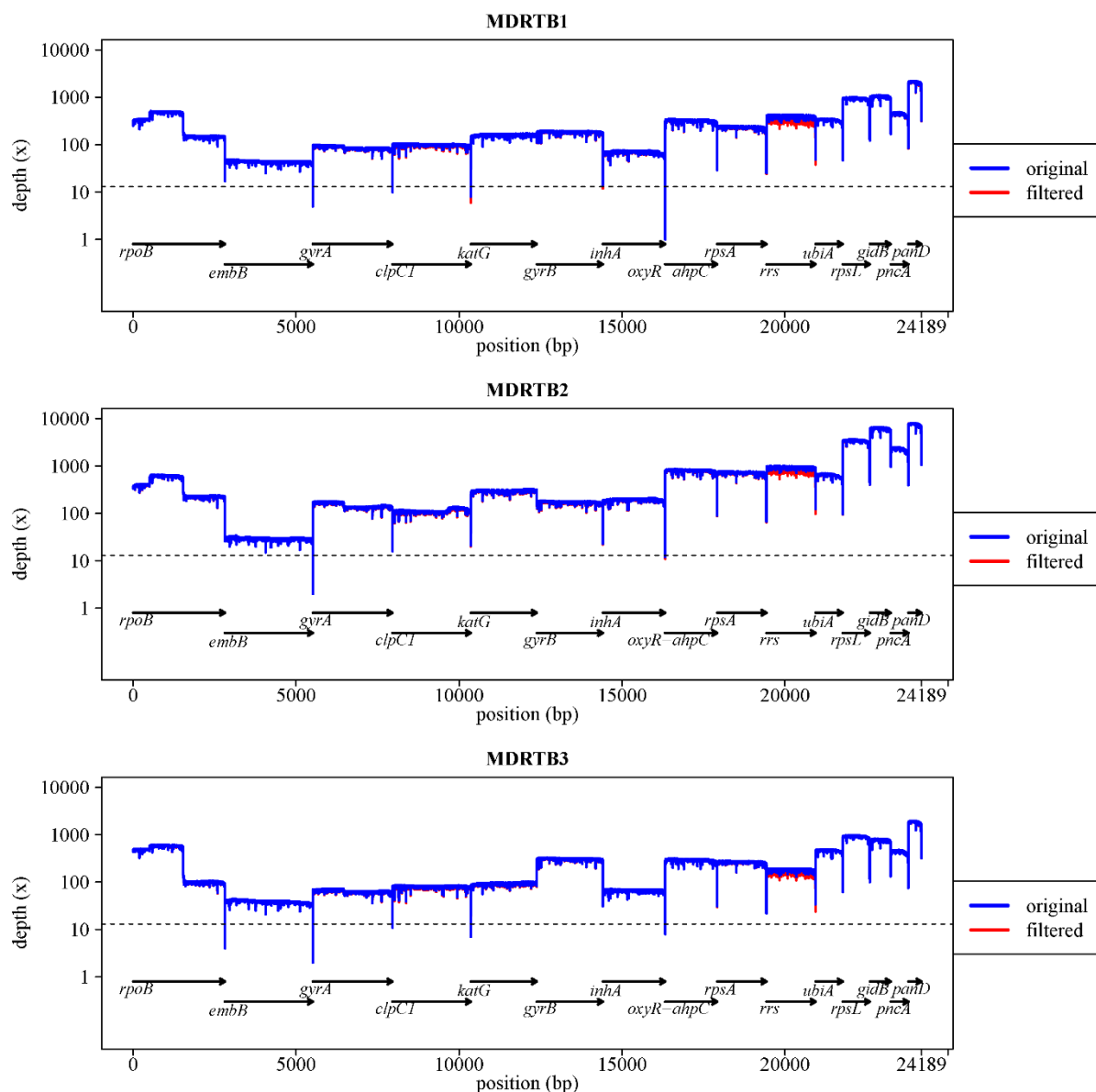


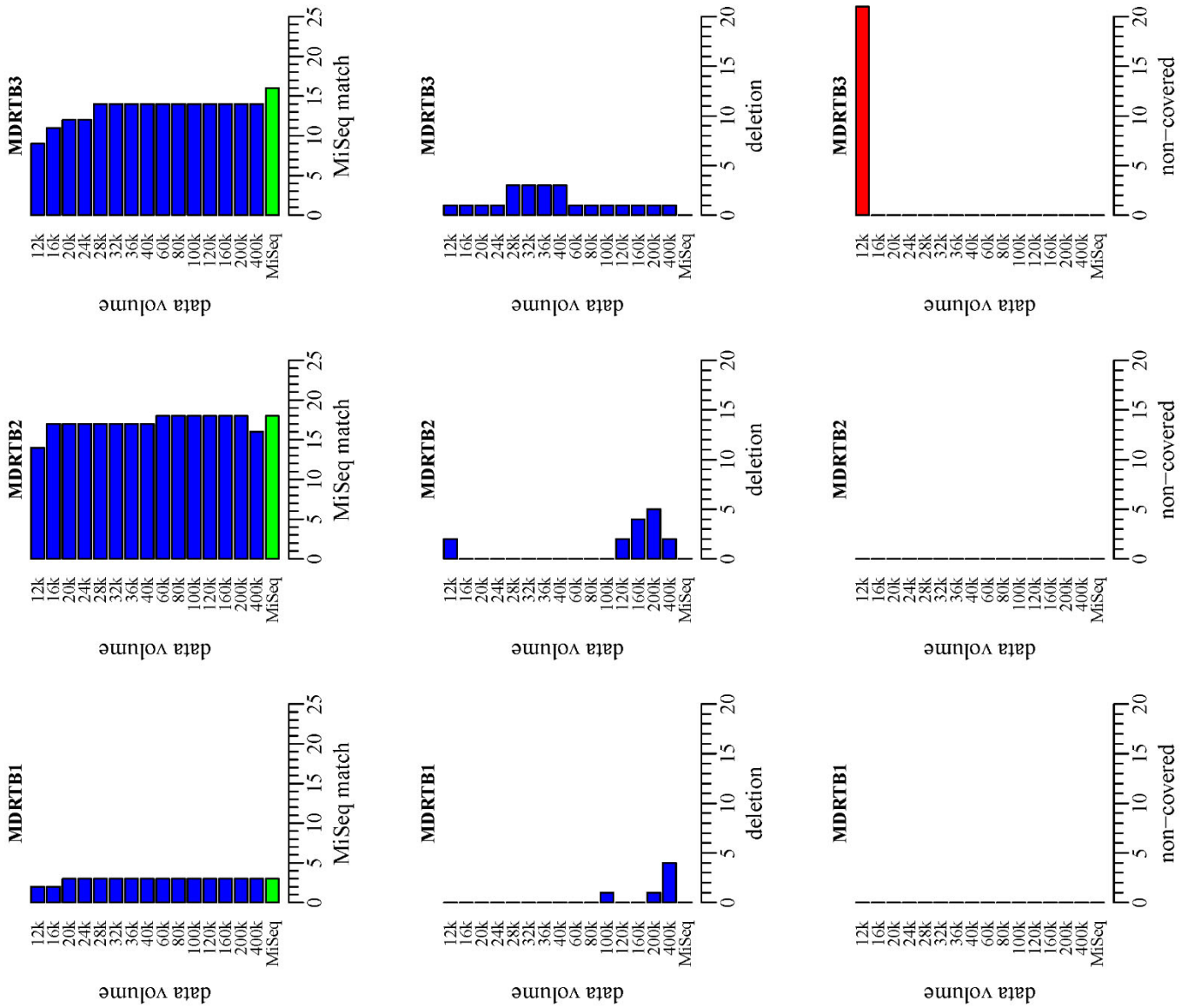
図 1 0

BLAST によるフィルタリングプログラムがカバレッジに及ぼす影響。軸および概要は図 9 と同じ。Run1 の 100 k のデータのみ図示。水平方向のダッシュ線はカバレッジ 13 x。

青：original (BLAST filter 前)、赤：filtered (BLAST filter 後)。フィルターがマッピングに影響を与えるのは *rrs* 遺伝子領域のみであり、カバレッジ減少も軽度であることがわかる。ほかの領域は *Mycobacterium* 属に特徴的な領域と考えられフィルタリングの影響はほとんど受けていない。



図 1 1 (A)



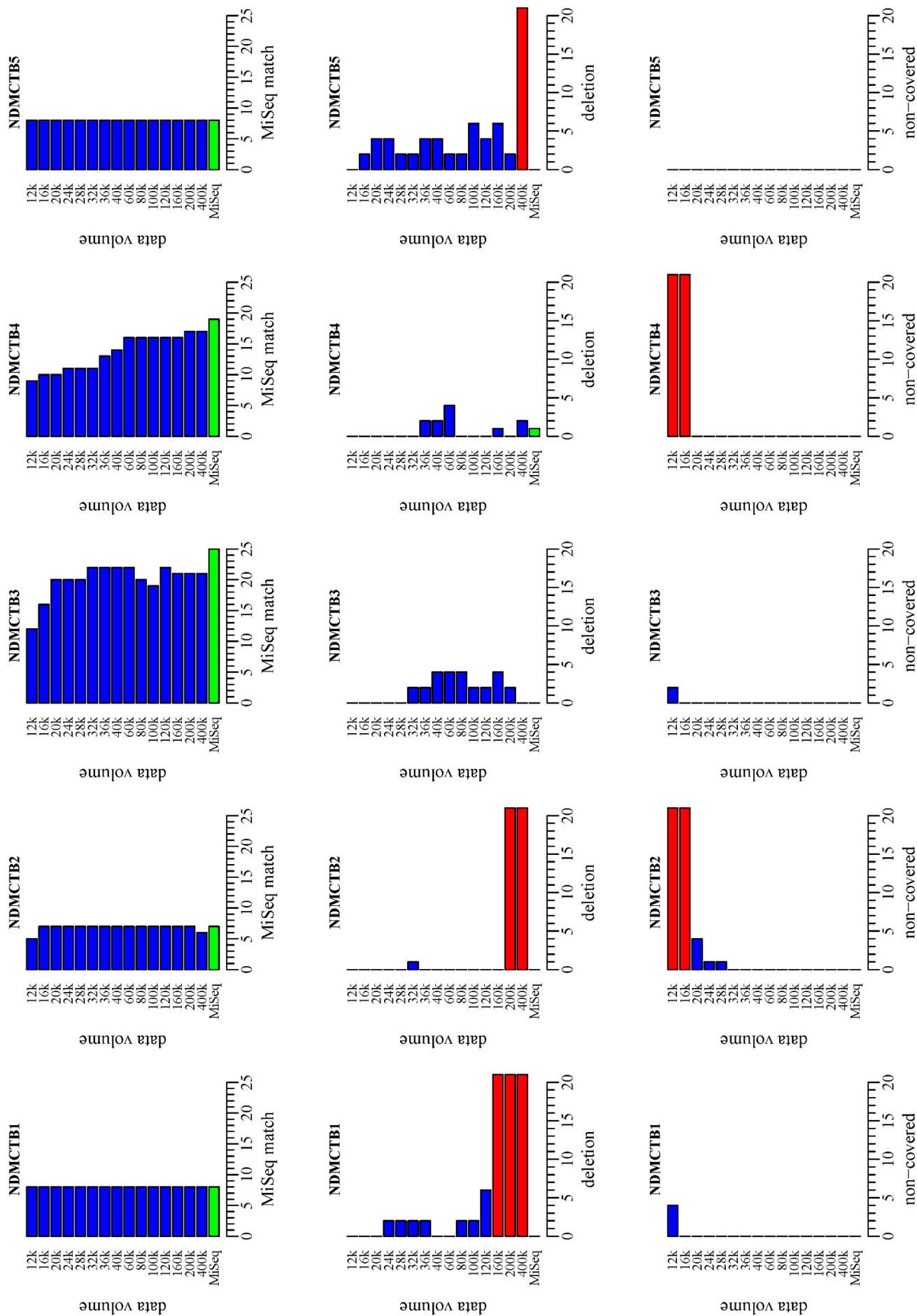


図 1 1

MiSeq を対照とした際の MinION のデータ精度。上段より MiSeq と一致する変異(MiSeq match)、欠損数(deletion)、およびリファレンス配列にマッピングされたリードがない部位の数 (non-covered) を示す。単位はすべて塩基数である。赤棒は塩基数が 21 を超えることを意味する。各グラフとも一番下に MiSeq のデータを緑棒で示している。MinION の FASTQ データはすべて original を利用している。(A) MDRTB 3 株、(B) NDMCTB 5 株のデータを表している。

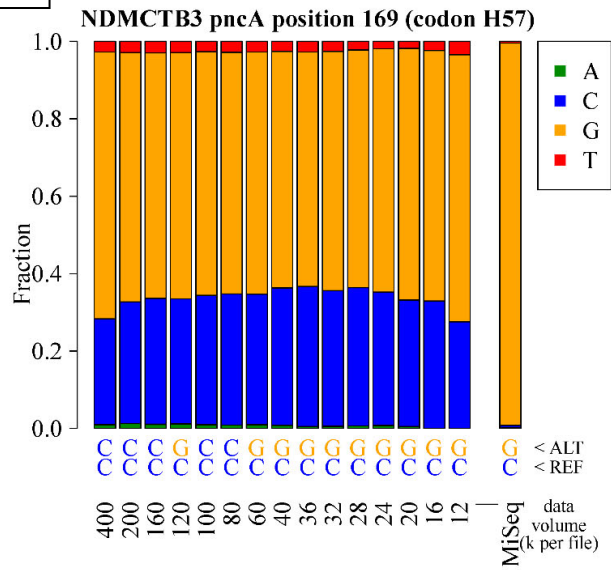
上段の一致数は、データ量の増加に伴い比較的早期に頭打ちしていくのに対して、中段の deletion 数は、データ量を増やしても改善せず、一部のサンプルでは大きくデータ量を増やすことでかえって deletion が大きく増加してしまったものがある。大きな deletion はほとんどが MiSeq では確認できず、偽りと考えられた。

対して真の insertion である 2 か所の部位については、MDRTB2 では MinION で正しく同定できたが、MDRTB3 では同定できておらず Figure では MinION のデータに deletion が最低 1 が入っていると判定されている。Run3 の NDMCTB4 の真の deletion も MiSeq では同定できていたが、MinION では同定できなかった。

下段はマッピング時にリードが全くマッピングされない塩基部位数を示しているが、シーケンス早期の 12 - 28 k 以外では全領域に少なくとも 1 本以上のリードがマッピングされていることがわかった。

1 2

(A)



(B)

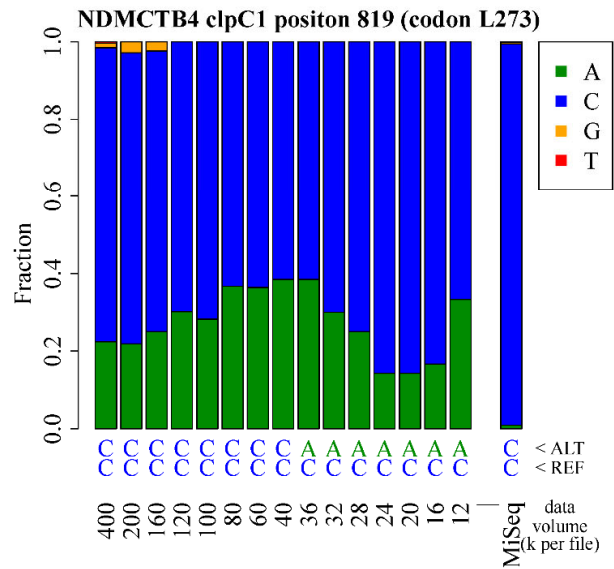
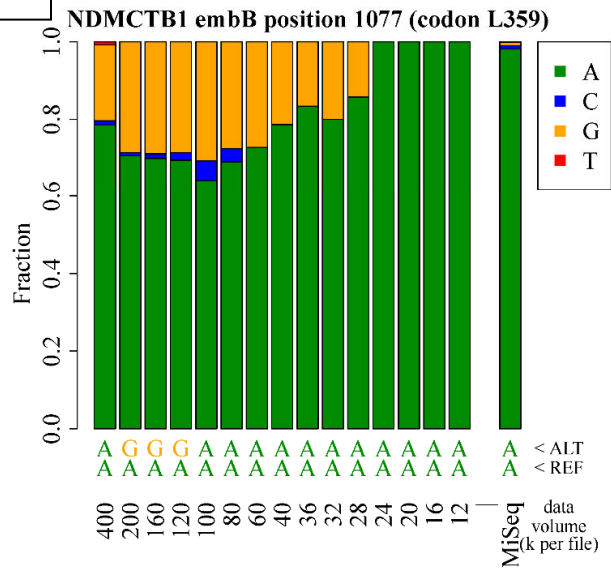


図 1 2

MinION で正しく判定できなかった塩基部位のマッピング時の塩基構成割合。

データ量ごとに、マッピング時の各部位の塩基構成割合を表している。縦軸は割合を示す。棒グラフ下の塩基文字は上段がバリエーションコールで判定された塩基を、下段がリファレンス配列の塩基を示している。各グラフとも右端に MiSeq のデータを載せている。

(A)NDMCTB3 における *pncA* 遺伝子内の耐性に関与があると考えられる SNP。同部位は SNP だが、MinION では 80, 100, 160, 200, 400 k でヘテロアレルと判定されたためフィルタリングすると変異なしと誤って判定される。ただし最も優位な塩基はいずれも G である。

(B)NDMCTB1 および NDMCTB4 の SNP 2 か所。同部位には変異はないが、一部のデータ量でヘテロアレルと判定されるため、ヘテロアレルを除外しない場合は変異として認識される。こちらも最も優位な塩基はそれぞれ A、C である。

上記の変異部位は MiSeq のデータではほぼ単一塩基として判定されていることから、MinION のエラーと考えられる。マッピング結果の変化によりこれらの部位はヘテロアレルと判定される。ヘテロアレルと判定された塩基部位を変異として許容する場合は変異部位をもれなく拾い上げることは可能であるが、その代わり(B)のように本来認めない変異部位を誤検出する恐れがあることが判明した。

表 1

本解析に用いた遺伝子配列情報の一覧。

菌種（菌株名）	遺伝子名・蛋白質名	Accession no.	塩基部位 （全長における）	引用元
<i>Haemophilus influenzae</i> (Rd KW20)	pbp1A	NC_000907	460645-463239	NCBI database*
	pbp1B		1796174-1798519	
	pbp2		33446-35401	
	pbp3 ( <i>fts-I</i> )		1197840-1199672	
	pbp4		1407458-1408897	
	pbp5		30229-31410	
	pbp7		387648-388526	
	<i>acrR</i>		946725-947288	
	<i>acrA</i>		947368-948516	
	<i>acrB</i>		948516-951614	
	<i>tolC</i>		1544120-1545439	
	<i>fucK</i>		643894-645306	
	<i>hpd</i>		732946-734040	
	16S rRNA		127172-128720	
	<i>recA</i>		621492-622556	
<i>H. influenzae</i>	<i>sodC</i>	M84012	1-799	NCBI database*
<i>H. influenzae</i>	<i>bexDCBA</i>	X54987	1-4005	(48)
<i>H. influenzae</i>	serotype a <i>cap</i> locus region II	Z37516	1-5882	(48)
<i>H. influenzae</i>	serotype b <i>cap</i> locus	X78559	1-8640	(48)
<i>H. influenzae</i> (RM127)	serotype c capsular DNA	Z33387	1-122	(48)
<i>H. influenzae</i> (RM128)	serotype d capsular DNA	Z33389	1-155	(48)
<i>H. influenzae</i> (RM129)	serotype e capsular DNA	Z33390	1-75	(48)
<i>H. influenzae</i> (70022)	serotype f capsular locus	AF549211	7744-16028	(48)

\* National Center for Biotechnology Information database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

表 2

本研究に用いた *H. influenzae* 菌株のうち、 $\beta$  ラクタマーゼ非産生の全 34 株の遺伝子型 (Genotype) および各抗菌薬の MIC。Genotype のうち、黒塗りの部分がその菌株の有する遺伝子変異に相当する。S/I/R の判定は CLSI に基づき、基準のない部分は空白としている。Strain No.のうち太字で灰色ハイライトのものは、SNP の解析の際に基準を満たさなかったため除外したものを示している。(遺伝子学的に *H. influenzae* と明確に判定できなかったもの：赤字の 2 株、データ不足により PBP をコードする遺伝子領域全長を決定できなかったもの：緑字の 5 株)

表 2 (1/2)

Strain No.	Genotype	SSN			KTG		AMP		CEC		CDR		CDN-PI		CTX		CRO	
		M377I	S385T	L389F	R517H	N526K	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR
12	group1						0.12	S	2	S	0.06	S	0.03		0.06	S	0.06	S
13	gBLNAS						0.12	S	1	S	0.25	S	0.03		0.06	S	0.06	S
15	group3						2	I	32	R	8		0.12		0.5	S	0.12	S
16	group3						2	I	16	I	4		0.25		1	S	0.25	S
17	group3 (517)						0.5	S	8	S	2		0.06		0.25	S	0.06	S
19	group1						1	S	4	S	1	S	0.03		0.06	S	0.06	S
21	group1						0.25	S	2	S	0.25	S	0.03		0.06	S	0.06	S
22	other (only SSN)						2	I	16	I	4		0.25		0.5	S	0.25	S
23	group3						2	I	32	R	8		0.12		0.5	S	0.25	S
24	group3						1	S	4	S	1	S	0.12		0.25	S	0.12	S
25	group3 (517)						1	S	8	S	2		0.06		0.25	S	0.12	S
27	group3						1	S	4	S	2		0.12		0.25	S	0.06	S
28	group3						1	S	4	S	1	S	0.12		0.5	S	0.25	S
29	group3						4	R	32	R	8		0.12		1	S	0.25	S
30	group1						0.25	S	2	S	0.12	S	0.03		0.06	S	0.06	S
31	group3						4	R	8	S	2		0.5		1	S	0.5	S
32	group3						2	I	8	S	2		2		0.5	S	0.12	S



表 2 (2/2)

Strain No.	Genotype	SSN			KTG		AMP		CEC		CDR		CDN-PI		CTX		CRO	
		M377I	S385T	L389F	R517H	N526K	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR	MIC	SIR
33	group3						4	R	32	R	8		4		1	S	0.5	S
34	gBLNAS						0.25	S	4	S	0.5	S	0.03		0.06	S	0.06	S
35	group3						2	I	64	R	8		0.25		0.5	S	0.12	S
36	group3						0.25	S	4	S	1	S	0.25		0.12	S	0.06	S
37	gBLNAS						0.25	S	1	S	0.5	S	0.03		0.06	S	0.06	S
39	group3						4	R	16	I	4		0.5		1	S	0.5	S
40	group3						1	S	4	S	1	S	0.25		0.5	S	0.12	S
41	group3 (517)						2	I	4	S	1	S	0.25		0.5	S	0.12	S
42	group1						0.25	S	4	S	0.25	S	0.03		0.06	S	0.06	S
43	group3						0.5	S	4	S	1	S	0.12		0.5	S	0.25	S
44	group2						0.5	S	8	S	1	S	0.03		0.06	S	0.06	S
45	group3						2	S	64	R	4		0.25		1	S	0.25	S
46	gBLNAS						0.25	S	4	S	0.5	S	0.03		0.06	S	0.06	S
47	gBLNAS						0.12	S	1	S	0.25	S	0.03		0.06	S	0.06	S
48	group3						0.5	S	4	S	1	S	0.5		0.25	S	0.12	S
49	group3						4	R	8	S	2		0.25		1	S	0.25	S
53	group3						16	R	64	R	8		0.25		1	S	0.25	S

表 3

本研究で、図 3 で示した 6 種類の抗菌薬のいずれかにおいて MIC と有意差を認めた *fts-I* 内の SNP 同士の相関係数。SNP 同士が互いに高い正の相関関係を有している。

SNP	D350N	S357N	M377I	S385T	L389F	V562L
D350N		0.924	0.924	0.924	0.795	0.739
S357N			0.846	1.000	0.860	0.798
M377I				0.846	0.860	0.798
S385T					0.860	0.798
L389F						0.928
V562L						

表 4

排出ポンプ系の変異部位の一つである *acrB* 領域における MIC と遺伝子型の関係。アミノ酸変異を伴う塩基変異を有する群と有さない群に分類し、これら 2 群の MIC に対して Mann-Whitney U 検定を行った（有意水準  $p < 0.05$ ）。本研究では *acrB* 内の SNP の有無と MIC との関連性に有意差は認めなかった。

遺伝子型	<i>acrB</i> 変異		
	有	無	p-value*
gBLNAS	3	2	0.739
Group I/II gBLNAR	3	3	0.657
Group III gBLNAR	10	13	0.828

表 5

本研究に用いたサンプルおよびシーケンス情報。

防衛医大検査室由来のサンプル名については、本研究において独自に命名している。

“MinION シーケンス”は1枚のフローセルで解析したサンプルを表す。1枚のフローセルで複数サンプルを解析する場合は、それぞれ異なるバーコードを付加している。

MinION シーケンス	サンプル名	サンプル内容 (株名)	バーコード
Run1	MDRTB1	ナショナルバイオリソースより、 (JNBP 03690)	BC01
	MDRTB2	ナショナルバイオリソースより、 (JNBP 03706)	BC02
	MDRTB3	ナショナルバイオリソースより、 (JNBP 03693)	BC03
Run2	NDMCTB1	防衛医大検査室より (NDMCTB1)	BC01
	NDMCTB5	防衛医大検査室より (NDMCTB5)	BC02
Run3	NDMCTB2	防衛医大検査室より (NDMCTB2)	BC01
	NDMCTB3	防衛医大検査室より (NDMCTB3)	BC02
	NDMCTB4	防衛医大検査室より (NDMCTB4)	BC03

表 6

マルチプレックス PCR に用いたプライマーおよび解析領域。プライマー名の中の“F”および“R”はそれぞれ forward primer および reverse primer を表す。(\*)の *rpoB\_1* および *rpoB\_2* により *rpoB* の positions 268–3,045 (codons 90–1,015) をカバーする。

セット	遺伝子名 (関連する薬剤名)	プライマー名**	プライマー配列(5' - 3' )	産物の長さ (bp)	遺伝子領域における対象領域 (プライマー部分を除く) *塩基部位(コドン)*で表記する。
A	<i>embB</i> (EMB)	<i>embB_F4246898</i> <i>embB_R4249571</i>	AACGTGGTGATCTTTGTCCGT TCGGTGTCCAGCTTCTTAGC	2,693	406-3,057 (codon 136-1,019)
	<i>gyrB</i> (FQ)	<i>gyrB_F5124</i> <i>gyrB_R7128</i>	TGGGTAAACACGAGGCCAGA CACTTGACGCCAACACACGAA	2,024	1-1,887 (codon 1-629)
	<i>rpoB_1</i> * (RIF)	<i>rpoB_F247</i> <i>rpoB_R1780</i>	GTGCTCTACGAGCTGTCTCC CGTGCTCCAGGAAGGGAATC	1,514	*
	<i>ubiA</i> (EMB)	<i>ubiA_F4269804</i> <i>ubiA_R4268992</i>	ATGTGGTGACTCAACCTCCG TCACGCAGCGCGATATCTT	832	35-818 (codon 12-272)
	<i>gyrA</i> (FQ)	<i>gyrA_F7374</i> <i>gyrA_R9798</i>	CAGCGCAGCTACATCGACTA TAAATGGCCCGTCTGGTCTGC	2,444	94-2,495 (codon 32-832)
	<i>katG</i> (INH)	<i>katG_F2154078</i> <i>katG_R2156085</i>	GTAGGTCCCCTCATCTGCTG AGCAACACCCACCCATTACA	2,027	28-2,013 (codn 10-671)
B	<i>rrs</i> (STR)	<i>rrs_F1471851</i> <i>rrs_R1473339</i>	TTTGGAGAGTTTGTATCTGGCT CTTCCGGTACGGCTACCTTG	1,508	28-1,493
	<i>gidB</i> (STR)	<i>gidB_F4408164</i> <i>gidB_R4407539</i>	GGCTCTGCGATCTTCGGA CTCCACTCGCCATCCGTG	643	46-640 (codon 16-213)
	<i>clpC1</i> (PZA)	<i>clpC1_F4029387</i> <i>clpC1_R4027003</i>	GCCAGGATGCTCAACCCAAA TGAAGGTGAACACCCGCTC	2,404	79-2,442 (codon 27-814)
	<i>fabG1-inhA</i> (INH)	<i>inhAprom_F1673292</i> <i>inhRprom_R1675187</i>	TCCGTCAATGGTCGAAGTGTG CCGCGATCAGTGTCCGATTA	1,915	<i>inhA</i> : codon 1-270 + <i>fabG1</i> : codon 1-248 + <i>inhA</i> promoter region
C	<i>rpsA</i> (PZA)	<i>rpsA_F1833576</i> <i>rpsA_R1835069</i>	CCGTCAACGCACATAGGCCTC CCGCATTGCGAGAACGTC	1,511	55-1,412 (codon 19-482)
	<i>pncA</i> (PZA)	<i>pncA_F2289203</i> <i>pncA_R2288685</i>	TGCACGTGCAGAACGACTTC GAGTGCACAAACCACTCGAC	538	40-537 (codon 14-179)
	<i>rpoB_2</i> * (RIF)	<i>rpoB_F758</i> <i>rpoB_R3067</i>	GATCGACGCTGGAGAAGGAC ACATGTAGCCCAACCGTGACC	2,290	*
	<i>oxyR-ahpC</i> (INH)	<i>oxyR-ahpC_F2725364</i> <i>oxyR-ahpC_R2726939</i>	GTCCTTTGACAGTCGTCGGCA TACCTGCGGATTTTCGTGTCG	1,595	<i>oxyR</i> : codon 1-234. + <i>ahpC</i> : codon 1-196 + intergenic region
D	<i>rpsL</i> (STR)	<i>rpsL_F781171</i> <i>rpsL_R781982</i>	GCACTGCATGGGTTGTGTCT ACCAACTGCCGATCCGTAGAC	831	1-375 + upstream / downstream (codon 1-125)
	<i>panD</i> (PZA)	<i>panD_F4044246</i> <i>panD_R4044246</i>	TGAAGTCGAAGATCCACCGC CTATCCACACCCGAGCC	404	37-402 (codon 13-134)

## 表 7

MinION データより得られた変異情報の一覧。

塩基変異のリストの項目は MiSeq により判定された変異部位をもと、それに対する MinION のデータを表している。そのため MinION にしか認められない変異はリスト内に含まれていない。

Ref：リファレンス配列の塩基、MiSeq：MiSeq データの塩基を示す。Ori：BLAST フィルターをかける前のデータによる結果。Fil：BLAST フィルターをかけた後のデータによる結果を示す。

Mutation pattern の codon の色は耐性との関連性を示す。赤：耐性に関与すると考えられる。黄：データが少ないものの、耐性株で認められた報告がある。青：耐性に関与しないとされる。緑：アミノ酸変異を伴わない変異。白：過去の報告例がなく不明。

各 Data volume の色は MiSeq と MinION の各データの対応を示す。赤ハイライト：MiSeq で見られた変異に MinION が一致した部位。白：MiSeq と MinION が一致しない部位。Insertion は Ref が“-”とすることで表現している。

多くの変異部位は MinION でもデータ量を増加させることで MiSeq とデータが一致していき、変異が判定可能であるが、一部の塩基部位および INDEL についてはその限りではなかった。Run1 における 2 か所ある insertion(MDRTB2 の *oxyR-ahpC* 領域、および MDRTB3 の *rpsL* 領域上流)の存在についてはサンガー法によって確認できたため、MDRTB3 の insertion は MinION では正しく同定できなかったと考えられた。*rrs* 遺伝子領域内の SNP は original のデータでは判定不能であったが、BLAST フィルター(Fil)の利用により判定可能であった。

(A) MDRTB1

Sample	Mutation Pattern						data volume ( k raw reads per sample )														
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
MDRTB1	1	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	2	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G
	3	<i>rpsL</i>	(-164)	T	C	upstream	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

## (B) MDRTB2

Sample	Mutation Pattern					data volume ( k raw reads per sample )															
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
MDRTB2	1	<i>embB</i>	916	A	C	M306V	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A
	2	<i>embB</i>	1490	A	C	Q497P	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A
	3	<i>fabG1</i>	696	C	T	I232I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	4	<i>gidB</i>	217	G	T	G73W	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	5	<i>gidB</i>	276	A	C	E92D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	6	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	7	<i>gyrA</i>	269	C	T	A90G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	8	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	9	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	10	<i>katG</i>	1388	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	11	<i>katG</i>	1647	T	G	C549W	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	12	<i>katG</i>	1873	A	G	T625A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	13	<i>oxyR-ahpC</i>	(-88 of oxyR)	-	G	intergenic region	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	-
	14	<i>pncA</i>	308	A	C	Y103S	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	15	<i>rpoB</i>	1349	C	T	S450L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	16	<i>rpsA</i>	636	A	C	R212R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	17	<i>rpsL</i>	upstream	T	C	(-164)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

## (C) MDRTB3

Sample	Mutation Pattern					data volume (k raw reads per sample)															
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
MDRTB3	1	<i>embB</i>	916	A	G	M306L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A
	2	<i>gidB</i>	276	A	C	E92D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	3	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	4	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	5	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G
	6	<i>gyrB</i>	1511	C	T	A504V	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	7	<i>katG</i>	431	C	T	A144V	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
	8	<i>katG</i>	1388	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G
	9	<i>oxyR-ahpC</i>	(-51 of <i>ahpC</i> )	C	A	intergenic region	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	10	<i>oxyR-ahpC</i>	(+31 of <i>ahpC</i> )	T	C	downstream of <i>ahpC</i>	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	11	<i>rpoB</i>	1349	C	T	S450L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	12	<i>rpsA</i>	368	A	C	D123A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	13	<i>rpsA</i>	636	A	C	R212R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A
	14	<i>rpsL</i>	(-164)	T	C	upstream	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	15	<i>rpsL</i>	(-153)	-	C	upstream	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	<i>rrs</i>	906	A	G	position 906	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
						Ori	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
						Fil	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G



(D) NDMCTB1

[illegible]

## (E) NDMCTB2

[illegible]

## (F) NDMCTB3

Sample	Mutation Pattern						data volume ( k raw reads per sample )															
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12	
NDMCTB3 (1/2)	1	<i>clpCI</i>	2302	T	C	L768L	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	
	2	<i>embB</i>	660	G	A	L220L	A	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	
	3	<i>embB</i>	1133	A	C	E378A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	
	4	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	5	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	6	<i>gyrA</i>	984	C	T	I328I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	
	7	<i>gyrA</i>	1323	G	T	R441R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G	
	8	<i>gyrA</i>	1440	C	T	R480R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	
	9	<i>gyrA</i>	1842	T	C	I614I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	
	10	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	11	<i>gyrB</i>	513	G	A	V171V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	12	<i>gyrB</i>	1167	C	T	N389N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	13	<i>gyrB</i>	1207	G	T	A403S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	14	<i>katG</i>	87	C	A	P29P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	
	15	<i>katG</i>	609	C	T	T203T	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	16	<i>katG</i>	1338	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G	
	17	<i>oxyR-ahpC</i>	26 of <i>oxyR</i>	G	A	(pseudogene)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G

表 7 (6/8)

Sample	Mutation Pattern					data volume ( k raw reads per sample )															
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
NDMCTB3 (2/2)	18	<i>pncA</i>	169	C	G	H57D	C	C	C	G	C	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	19	<i>rpsA</i>	1318	G	A	A440T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	20	<i>rpsL</i>	(-164)	T	C	upstream	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	21	<i>rpsL</i>	9	C	T	T3T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	C
	22	<i>ubiA</i>	145	G	A	V49I	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	23	<i>ubiA</i>	228	T	C	R76R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	24	<i>ubiA</i>	447	A	C	E149D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	25	<i>ubiA</i>	483	C	T	A161A	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	C	C	T	T	T

表 7 (7/8)

(G) NDMCTB4

Sample		Mutation Pattern					data volume ( k raw reads per sample )																	
		No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	200	160	120	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
NDMCTB4 (1/2)	1	<i>clpC1</i>	118	T	C	V63A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
	2	<i>embB</i>	1065	G	A	L355L	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	3	<i>embB</i>	1133	A	C	E378A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A
	4	<i>fabG1</i>	-17 of <i>fabG1</i>	G	T	<i>inhA</i> promoter -17 G to T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	5	<i>gidB</i>	98	G	-	W35- frameshift	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	6	<i>gidB</i>	330	G	T	V110V	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	7	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	8	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	9	<i>gyrA</i>	1151	C	T	A384V	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	10	<i>gyrA</i>	1842	T	C	I614I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T
	11	<i>gyrA</i>	1959	G	C	L653L	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
	12	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G
	13	<i>gyrB</i>	873	G	C	M291I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	14	<i>katG</i>	1388	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	15	<i>oxyR-ahpC</i> (-141 of <i>ahpC</i> )		G	A	intergenic region	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

表 7 (8/8)

Sample		Mutation Pattern				data volume ( k raw reads per sample )															
		No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon														
NDMCTB4 (2/2)	16	<i>rpsL</i>	(-164)		T	C	upstream	400	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	17	<i>rrs</i>	906		A	G	position 906	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	18	<i>ubiA</i>	228		T	C	R76R	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	A	A
	19	<i>ubiA</i>	447		A	C	E149D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

(H) NDMCTB5

Sample		Mutation Pattern					data volume ( k raw reads per sample )															
		No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
NDMCTB5	1	<i>gidB</i>	276	A	C	E92D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	2	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	3	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	4	<i>gryA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	5	<i>katG</i>	1388	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	6	<i>rpoB</i>	1635	C	G	D545E	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	7	<i>rpsA</i>	636	A	C	R212R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	8	<i>rpsL</i>	(-164)	T	C	upstream	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

## 表 8

MiSeq および MinION のエラー率および INDEL の割合。

エラー率はマッピング時にリファレンス配列と異なる塩基部分の数を分子とし、マッピングされた全塩基数を分母として計算した。そのため仮に完全に正しいシーケンス結果であっても、サンプルの変異部位は当然リファレンス配列とは異なることからエラーとしてカウントされるため 0 % になることはない。INDEL の割合は、同様にそれぞれの塩基数をマッピングされた全塩基数で除したものである。

この結果からは同一サンプル内において MiSeq に比較して MinION では 10 倍程度のエラーが認められた。また INDEL も MinION では MiSeq より高頻度で検出されるが、実際はこれらのほとんどは偽陽性であると考えられた。サンプル間でのエラー率、INDEL の割合に大きな変動は見られなかったことから、シーケンス機器の問題に由来すると考えられた。

表 8

サンプル名	解析方法	マッピングされた塩基数 (塩基数)	リファレンス配列と異なる塩基数 (塩基数)	エラー率 (%)	deletion 数 (塩基数)	deletion の割合 (100 塩基あたり)	insertion 数 (塩基数)	insertion の割合 (100 塩基あたり)
MDRTB1	MinION (400 k)	31,218,926	3,422,755	10.96	1,239,254	3.9696	1,236,297	3.9601
	MiSeq	200,340,112	2,133,412	1.06	6,088	0.0030	4,586	0.0023
MDRTB2	MinION (400 k)	89,429,157	11,225,646	12.55	3,809,153	4.2594	4,210,029	4.7077
	MiSeq	138,612,726	1,584,266	1.14	4,342	0.0031	9,553	0.0069
MDRTB3	MinION (400 k)	29,397,970	3,118,356	10.61	1,095,388	3.7261	1,189,272	4.0454
	MiSeq	201,843,529	1,782,510	0.88	5,155	0.0026	36,821	0.0182
NDMCTB1	MinION (400 k)	36,197,681	3,781,638	10.45	1,555,484	4.2972	1,165,785	3.2206
	MiSeq	196,634,229	1,921,188	0.98	6,723	0.0034	5,014	0.0025
NDMCTB2	MinION (400 k)	46,228,413	5,293,567	11.45	1,501,223	3.2474	2,412,362	5.2184
	MiSeq	224,840,587	2,803,558	1.25	13,225	0.0059	8,640	0.0038
NDMCTB3	MinION (400 k)	56,294,919	5,812,725	10.33	1,784,831	3.1705	2,455,174	4.3613
	MiSeq	271,224,292	3,636,526	1.34	11,373	0.0042	10,699	0.0039
NDMCTB4	MinION (400 k)	49,840,378	5,214,128	10.46	1,548,144	3.1062	2,298,438	4.6116
	MiSeq	167,255,399	2,604,459	1.56	6,893	0.0041	6,235	0.0037
NDMCTB5	MinION (400 k)	49,901,647	5,250,558	10.52	2,160,514	4.3295	1,702,188	3.4111
	MiSeq	275,239,309	2,455,002	0.89	8,525	0.0031	6,690	0.0024

## 表 9

NDMCTB3 において、バリエントコール条件を改め再解析した結果。詳細は第 3 章 3 節 3 項に示す。表 7 (F)と比較して多くの変異部位が正しく検出できるようになっている。ただし *embB* L220 (アミノ酸変異を伴わない synonymous SNP) については 100 k, 80 k で正しく認識できなかった。



表 9 (1/2)

Sample	Mutation Pattern						data volume ( k raw reads per sample )														
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
NDMCTB3 (改良版) (1/2)	1	<i>clpC1</i>	2302	T	C	L768L	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T
	2	<i>embB</i>	660	G	A	L220L	A	A	A	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
	3	<i>embB</i>	1133	A	C	E378A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A
	4	<i>gidB</i>	615	A	G	A205A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	5	<i>gyrA</i>	284	G	C	S95T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	6	<i>gyrA</i>	984	C	T	I328I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C
	7	<i>gyrA</i>	1323	G	T	R441R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G
	8	<i>gyrA</i>	1440	C	T	R480R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
	9	<i>gyrA</i>	1842	T	C	I614I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
	10	<i>gyrA</i>	2003	G	A	G668D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G
	11	<i>gyrB</i>	513	G	A	V171V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	12	<i>gyrB</i>	1167	C	T	N389N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	13	<i>gyrB</i>	1207	G	T	A403S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	14	<i>katG</i>	87	C	A	P29P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C
	15	<i>katG</i>	609	C	T	T203T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
	16	<i>katG</i>	1338	G	T	R463L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G
	17	<i>oxyR-ahpC</i>	26 of <i>oxyR</i>	C	T	(pseudogene)	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C

Sample	Mutation Pattern					data volume ( k raw reads per sample )															
	No.	gene	position	Ref	MiSeq	codon	400	200	160	120	100	80	60	40	36	32	28	24	20	16	12
NDMCTB3 (改良版) (2/2)	18	<i>pncA</i>	169	C	G	H57D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	19	<i>rpsA</i>	1318	G	A	A440T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	20	<i>rpsL</i>	(-164)	T	C	upstream	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	21	<i>rpsL</i>	9	C	T	T3T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	22	<i>ubiA</i>	145	G	A	V49I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	23	<i>ubiA</i>	228	T	C	R76R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	24	<i>ubiA</i>	447	A	C	E149D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	25	<i>ubiA</i>	483	C	T	A161A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

