

マイクロバイオーム解析手法の最適化と Mock community

三浦 隆匡

読者の皆様は、自ら、あるいは論文で報告されたデータが正しい方法で正しく得られたものなのか疑問に思うことはないだろうか。たとえ同じ研究室内で取得したデータであっても、ピペットや機器のキャリブレーションをしばらくしていないことによる性能劣化や、試薬のロットや管理状態などから少なからず影響を受けている可能性があり、「これまでと同じプロトコルだから今回も同等の結果だろう」と盲目的に信頼してしまうのは少々危険である。

最新の研究により、腸内細菌や土壌細菌などの微生物集団（マイクロバイオーム）と宿主や環境の間には深い関わりがあることが明らかになってきており、医療・製薬、食品、環境などの分野においてマイクロバイオームを利用した新規製品開発への期待が高まっている。そのため、このマイクロバイオームを理解するために世界中のアカデミアや企業などで、さまざまなオミックス解析が精力的に行われている。この中でも、新型シーケンサーを用いて、解析対象サンプルから抽出したDNAを丸ごと解読するメタゲノム解析や、16S rRNA 遺伝子をPCR増幅した後に網羅的にシーケンスするメタ16S解析が一般的に実施されている。本解析はサンプル採取と保存に始まり、解析実施機関への輸送、DNA抽出、シーケンス用ライブラリーの調製、シーケンス、データ解析までと、その工程は多岐にわたる。各工程における方法は解析実施機関によってさまざまであり、その違いや作業者間の手練の差などから生ずるバイアスが積み重なって、解析結果に大きく影響を与えてしまうことが報告されている^{1,2)}。このため、異なる方法や解析により取得されたデータや結果の解釈には偏りが生じてデータの互換性が低くなり、他者の結果と正確に比較できないばかりか、誤った結論に至ってしまうおそれがある。

ヒトマイクロバイオーム分野では、欧州が中心となって、International Human Microbiome Standard (IHMS) によって各工程の標準作業手順書 (SOP) が策定され、プロトコルQという標準的なDNA抽出方法が開発された¹⁾。米国では、2018年4月にマイクロバイオーム研究のための省庁間戦略計画³⁾が作成され、そこでは、基盤技術として標準プロトコルや参照物質の開発が推奨されている。また、米国国立標準技術研究所 (NIST) が中心となり、International Metagenomics and Microbiome

Standards Alliance (IMMSA) が組織されている。我が国においては、一般社団法人日本マイクロバイオームコンソーシアム (JMBC) により、マイクロバイオーム研究における推奨プロトコルの作成が進められている。このように、世界中でマイクロバイオーム解析工程の標準化や最適化に向けた取組みが進行中である。

解析工程の最適化には、同じサンプルを用いてさまざまなプロトコルを横断的に評価するための標準サンプルが必要である。このサンプルは実サンプル（糞便など）でも構わない。しかし、妥当性確認試験（バリデーション）や最適化のためには、あらかじめ“答え”があることが望ましいため、目的の環境を模すように複数の微生物種が既知の割合で混合されたMock communityがよく用いられる。さまざまな論文でオリジナルのMock communityが使用されているが、製品として、国産ではNBRC、外国産ではATCCやZymoResearch社のMock communityが購入できる。それぞれから、微生物細胞あるいはDNAが混合されたMock communityが入手可能であり、目的に応じた使い分けが可能である。製品としてのMock communityの魅力の一つは、品質管理されたほぼ同一のサンプルがいつでも入手できることにあり、作業者や研究室間の手練の比較やSOPの標準サンプルとして利用しやすい。メタゲノム解析手法の開発においてはベンチマークテスト用に使用され始めている⁴⁾。

製造業などにおいては、製品を製造するための設備、製造工程、品質管理まで適切な状態であるかを検証するバリデーションや、計画通りの製品が製造できたことを確認する検証試験（ベリフィケーション）が当たり前に行われている。研究現場も同様に、研究データの信頼性向上のために、データを取得するための機器や実験手法のバリデーション、データのベリフィケーションが今後求められる可能性がある。マイクロバイオームを正しく理解して応用していくために、標準サンプルとしてのMock communityの活用が期待される。

- 1) Costea, P. I. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **35**, 1069 (2017).
- 2) Sinha, R. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **35**, 1077 (2017).
- 3) *Interagency Strategic Plan for Microbiome Research, FY 2018–2022, United States* (2018).
- 4) Bishara, A. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **36**, 1067 (2018)