

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10029

研究課題名(和文)新規ポータブルシーケンサーを用いた網羅的微生物叢の解析-NTM感染症の病態解明-

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the microflora using a novel portable sequencer MinION

研究代表者

前田 卓哉 (Takuya, Maeda)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20383763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺の微小環境におけるさまざまな病原体について、網羅的かつ定量的に検出する技術の開発を目指し実施した。そのため、これまでの培養法に基づく手法ではなく、採取した臨床検体からすべてのDNAを抽出・精製したのち、ナノポアシーケンス技術を活用した。この方法では、得られたゲノムデータのコンピュータ解析することで、さまざまな病原体とその存在比率が解明できるメリットがあるが、多彩な性質をもつ病原体について、定量性を維持したDNA抽出・精製ができるかどうかが本研究成果の鍵となる。本研究では、肺の微小環境に存在する菌の性状を検証し、ナノポアシーケンスによる網羅的な病原体解析法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、国内で増加する非結核性抗酸菌症の診断と病態解明に活用できる検査法の確立にとどまらず、さまざまな感染症診断に展開できる新しい微生物同定技術へと発展できる可能性がある。この成果により、これまで診断が困難であった病原微生物の感染を同定することができ、実際の治療に役立つ可能性があるほか、下気道における微生物の病態への関与を解析できるツールとなりうることに意義がある。さらに、抗菌薬の感受性についても網羅的に検出することが可能となり、国内における薬剤耐性対策に寄与する可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a technology for comprehensive and quantitative detection of various pathogens in the lung microenvironment. Particularly, we used nanopore sequencing technology, rather than the conventional culture-based method, using extracting and purifying all DNA from the collected clinical specimens. This method has the advantage that computer analysis of the obtained sequence reads allows simultaneous elucidation of different pathogens and their microbiota. In this study, we have characterized various pathogens present in the lung microenvironment, established a comprehensive protocol to extract and purify various pathogens derived from clinical specimens, and established a sequence analysis method using a nanopore sequencer, MinION.

研究分野：感染症学

キーワード：ナノポアシーケンサー MinION 微生物叢 非結核性抗酸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌感染症(NTM 症)は、結核症が減少するなか、なおも増加している慢性抗酸菌感染症の1つであり、抗酸菌塗抹陽性患者の30%、女性においては50%がNTM 症であった。我が国では14種の抗酸菌が病原性に関連すると言われており、その診断のGold Standardは培養検査であるものの、培養検体の採取方法もしくは検査のタイミングにより培養されたNTMの菌種が真の起縁菌であるかどうか、ほかに混合感染するNTMが存在するのか、正確に診断することが困難であった。一方、肺病変が急速進行性に拡大する肺NTM 症も経験するが、一部の患者では嫌気性菌群が関与している可能性が報告されるなど(Yamasaki K, Respiriology 2015) 肺病変の局所における微生物叢の病態への関与が示唆されていた。

一方、研究開始当時のNTMに関する解析の多くは培養検査でのみ行われており、病原性が明らかになっていない菌種を含むNTMの微生物叢は明らかにはされていなかった。特に、下気道の研究は遅れており、NTM 症に対する網羅的な下気道細菌叢解析はほとんど報告がなかった。また、メタゲノム解析にはほとんどが16S-rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスに基づいており、NTM や真菌など16S-rDNA の解析では明らかにできない微生物の関与は不明であった。さらに、アンプリコンシーケンスによるメタゲノム解析では、PCRの増幅効率が同一である必要があるうえ、近縁の菌種では正確な分離・同定ができないなどの限界があった。

2. 研究の目的

本研究では、ナノポア・シーケンサーであるMinION ポータブル・シーケンサーを用い、遺伝子増幅を行わず、すべてのDNAをシーケンスすることで、網羅的な微生物叢の解析が可能な「微生物叢POCT 検査」の確立を目指した。さらに、確立したシーケンス技術と解析パイプラインを駆使し、肺NTM 症の病像と、病変局所から採取した検体の微生物叢との関連を明らかにすることを目的とした。特に、これまでのアンプリコンシーケンスに基づく微生物叢の研究と異なり、特定の遺伝子領域の増幅を行わないことから増幅効率を考慮する必要がなく、より長い塩基長のシーケンス配列をもとに各リードの種同定を行うことから、より精度の高い微生物叢の解析を可能にすることが特色である。しかも、同時に得られる配列情報を解析することで、抗菌薬感受性までもが正確に判定でき、臨床的意義が高いと考えた。

本研究では、NTM 症における局所の網羅的な微生物叢の解析にとどまらず、臨床検体から直接的にさまざまな病原体をハイスループットに同定できる検査技術の確立が目的である。本研究により、将来の細菌検査の方法を根底から覆す新規技術が提案できると考えた。

3. 研究の方法

ナノポア・シーケンス理論に基づく微生物叢解析では、高い精度で微小環境に存在する病原体からDNAを抽出し、シーケンスに阻害的に働く夾雑物をいかに効率的に除去できるかが鍵となる。一方、下気道の微小環境では、NTMを含む抗酸菌とともに、グラム陰性菌、口腔内常在菌を含むグラム陽性菌および真菌など多彩な微生物が病原性に関与している。しかも、ナノポア・シーケンスによる微生物叢の解析パイプラインについては、本研究計画を作成した以後に多くの論文が報告され、技術的には速やかに確立することとなった。以上のような研究環境の変化に伴い、本研究計画では、さまざまな病原体ならびに夾雑物を含む臨床検体から均一なDNAを効果的に抽出し、シーケンスリードの情報解析が安定して実施できるようにすることで、正確な起炎菌種の同定、微生物叢解析、そして抗菌薬耐性遺伝子変異の保有状況を網羅的に検出できる手法の確立に舵を切ることとした。

1) 最適なDNA抽出・精製方法の検証

さまざまな病原体を用い、酵素学的および機械的手法を用いてDNAを抽出し、もっとも効果的にシーケンス・リードが得られる方法について検証した。特にストレプトコッカス属菌では菌体の破砕が不十分となることが判明したが、これらは肺炎球菌や口腔内常在菌が含まれるため、特に詳細な検証が必要であった。使用したのは、Proteinase K, Lysostaphin, Mutanolysin などの酵素学的処理のほか、マイクロビーズ破砕にともなうシーケンス・リードへの影響なども検証し、最適な前処理方法を決定した。

2) ナノポア・シーケンスへの阻害となる夾雑物の検証とその精製方法についての検証

下気道から採取した検体では血液を混じることがあり、その効果的な除去が必須となる。本研究では、出血を含む下気道検体での解析を検証するための材料の入手が困難であったことから、実際には血液培養ボトル内の微生物叢解析、ならびに人工的に血液を病原菌の懸濁液にパルスした擬似検体を用いて最適な抽出方法を検証した。検証にはさまざまな市販キットを使用したほか、磁気ビーズ法や多孔質吸着体などを検証し、正確な微生物叢の決定が可能なパイプラインの構築も合わせて実施した。

3) 菌種同定と微生物叢解析に必要なパイプラインの構築

臨床検体のナノポア・シーケンスの結果、MinIONにより出力されるシーケンス・リード・データの解析方法について検証を行い、マッピングによる菌種同定から微生物叢解析を行うまでの解析パイプラインを構築した。

4) 薬剤耐性遺伝子検出の検証

ナノポア・シーケンス理論では、微生物叢を決定できると同時にすべての遺伝子情報の入手が可能である。一方、シーケンス・エラーの存在から、一塩基置換(SNP)による耐性遺伝子変異の検出には注意が必要であることが判明した。そこで、特定の遺伝子領域を増幅しない long-read シーケンスのほか、精度を高めるためにアンプリコン・シーケンスによる遺伝子解析法を併用し、薬剤耐性遺伝子検出が可能であるかどうかを検証した。

4. 研究成果

下気道検体のシーケンス解析に必要な不可欠な病原菌の解析パイプラインの構築と、適切なシーケンス処理の方法を確立した。

1) 抗酸菌群のナノポア・シーケンスによる菌種同定、ならびに国内で使用する抗結核薬の感受性に関わる遺伝子変化を網羅的に同定する技術を確立し、国際学術集会においてその成果を公表した。本方法では、*rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *rpsL*, *rrs*, *gidB*, *embB*, *ubiA*, *clpC1*, *rpsA*, *pncA*, *pan*, *gyrA*, *gyrB* のすべての領域を網羅的に multiple PCR 法で増幅したものを前処理し、一度にナノポア・シーケンスを行うことですべてのアンプリコン・シーケンスを行うことで、抗結核薬に対する耐性変異の有無を検出することに成功した。本研究の成果により、臨床検体から直接的に DNA を抽出し、結核菌を含む抗酸菌の菌種の同定とともに、同一サンプルから抗結核薬の耐性変異を培養法によらず検出できる解析技術が確立できた。

2) 肺炎球菌を含むストレプトコッカス属菌の同定は、下気道の微生物叢の解析に必須の課題である。本研究により、Mutanolysin で前処理して核酸抽出を行うことで、効果的にナノポア・シーケンスによりシーケンス・リードを回収することに成功した。このことから、微生物叢解析が可能となり、これまでの生化学的手法では鑑別が困難であった *Streptococcus mitis* とその近縁の菌種との正確な同定を可能にできた。本研究の成果は国際学術雑誌において報告した。

3) 血液培養ボトルにおいて増幅された敗血症の起因菌の同定を行うため、MinIONによる微生物叢解析の理論を応用し、網羅的な菌種の同定とともに薬剤耐性遺伝子の検出方法を構築した。本研究では、血液培養液から DNA を抽出・精製し、16S-rRNA 等の特定の遺伝子を増幅することなく直接的にナノポア・シーケンスを実施した。さらに、ボトル内に存在するすべての病原菌の遺伝子を網羅的に同定するとともに、ESBL 産生遺伝子の存在の有無が判定できるようパイプラインを構築した。本技術では、培養困難菌の同定が可能となるほか、抗菌薬感受性が同時に判定できるなど、臨床的意義の高い新しい菌種同定技術となりえると考えた。本研究の成果は、国際学術雑誌において報告した。

本研究計画の当初の目的は、ナノポア・シーケンス技術を活用し、肺下気道検体から網羅的に微生物叢を明らかにできる技術の確立であった。しかしながら当初に予測していなかったシーケンスのための前処理技術の確立に時間を要したため、実際の下気道検体の解析までを研究期間内に完了することができなかった。今後、確立した上記技術をもとに、すでにサンプリングを開始している臨床検体に活用し、その診断的意義の検証を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ashikawa Sae, Tarumoto Norihito, Imai Kazuo, Sakai Jun, Kodana Masahiro, Kawamura Toru, Ikebuchi Kenji, Murakami Takashi, Mitsutake Kotaro, Maesaki Shigefumi, Maeda Takuya	4. 巻 67
2. 論文標題 Rapid identification of pathogens from positive blood culture bottles with the MinION nanopore sequencer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1589 ~ 1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.000855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Jun, Tarumoto Norihito, Kodana Masahiro, Ashikawa Sae, Imai Kazuo, Kawamura Toru, Ikebuchi Kenji, Murakami Takashi, Mitsutake Kotaro, Maeda Takuya, Maesaki Shigefumi	4. 巻 68
2. 論文標題 An identification protocol for ESBL-producing Gram-negative bacteria bloodstream infections using a MinION nanopore sequencer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Kazuo, Nemoto Rina, Kodana Masahiro, Tarumoto Norihito, Sakai Jun, Kawamura Toru, Ikebuchi Kenji, Mitsutake Kotaro, Murakami Takashi, Maesaki Shigefumi, Fujiwara Taku, Hayakawa Satoshi, Hoshino Tomonori, Seki Mitsuko, Maeda Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid and Accurate Species Identification of Mitis Group Streptococci Using the MinION Nanopore Sequencer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takuya Maeda
2. 発表標題 Evaluation of MinION sequencer for identification of pathogens from positive blood cultures in bloodstream infections.
3. 学会等名 3rd Technology Seminar on the MinION sequencing, Manado, Indonesia. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Sakai, Norihito Tarumoto, Kazuo Imai, Takuya Maeda, Shigefumi Maesaki
2. 発表標題 A method using the MinION nanopore sequencer for detecting bacteria and ESBL-producing species in the bloodstream
3. 学会等名 The 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhisa Misawa, Takaaki Hamamoto, Kazuo Imai, Norihito Tarumoto, Akihiko Kawana, Shigefumi Maesaki, Takuya Maeda
2. 発表標題 Constructing the rapid detection methods of drug-resistance mutation of tuberculosis using mobile nanopore sequencer MinION
3. 学会等名 The 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井純、樽本憲人、今井一男、前田卓哉、前崎繁文
2. 発表標題 血液培養陽性例におけるナノポア型ポータブルシーケンサーMinIONの菌種同定能の検討
3. 学会等名 第93回日本感染症学会 総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三沢和央、濱本隆明、今井一男、樽本憲人、藤倉雄二、前田卓哉、前崎繁文、川名明彦
2. 発表標題 ナノポアシーケンサーを使用した結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子領域の解析
3. 学会等名 第93回日本感染症学会 総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田卓哉
2. 発表標題 Practical uses of MinION sequencer at clinical settings in Japan
3. 学会等名 2nd Technology Seminar on the MinION sequencing, Bangkok, Thailand (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樽本憲人、今井一男、根本莉奈、酒井純、前田卓哉、関みつ子、早川智、村上孝、前崎繁文
2. 発表標題 Streptococcus pneumoniaeとStreptococcus mitisの鑑別におけるMinIONの有用性
3. 学会等名 第29回臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根本莉奈、今井一男、河村 亨、樽本憲人、前田卓哉、村上孝、前崎繁文
2. 発表標題 MinIONによるストレプトコッカス属鑑別
3. 学会等名 第54回日臨技 関甲信支部・首都圏支部医学検査学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蘆川彩瑛、酒井純、河村亨、樽本憲人、前田卓哉、村上孝、前崎繁文
2. 発表標題 血液培養陽性検体におけるナノポア型シーケンサーの病原微生物同定能の検討
3. 学会等名 第54回日臨技 関甲信支部・首都圏支部医学検査学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	各務 博 (Kagami Hiroshi) (30418686)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究 分担者	鈴木 穰 (Suzuki Yutaka) (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	