

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08785

研究課題名(和文)らい菌の網羅的SNP解析 - 少菌型・多菌型決定因子、薬剤耐性変異、型別の解析 -

研究課題名(英文) Comprehensive SNP analysis of Mycobacterium leprae: determinant factor of paucibacillary and multibacillary, missense mutations in drug resistance determining regions, and SNP genotype

研究代表者

岩尾 泰久 (Iwao, Yasuhisa)

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官

研究者番号：90813684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：らい菌はハンセン病の原因菌で、その病型には多菌型と少菌型がある。両病型由来のらい菌の薬剤耐性とSNP型別を同時に同定できる、NGS解析を併用したNested Multiplex PCR法の開発を行った。開発した方法を用いて、2人の少菌型ハンセン病患者、9人の多菌型ハンセン病患者、6人の病型未定ハンセン病患者の臨床検体を解析した。少菌型の検体を含め、全検体の薬剤耐性とSNP型別を同定した。型別では1A、1D及び3K型が同定された。ブラジルの検体から1A型を初めて検出した。薬剤耐性に関しては、3K型の3検体でfolP1のアミノ酸配列53位と55位に変異を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

らい菌は人工培養できないため、薬剤耐性診断や感染経路の特定はDNA検査に依存している。少菌型臨床試料ではらい菌DNAは微量であり、ヒトDNAが多量に混在するため、ゲノム解析は困難である。そのため、らい菌の遺伝子解析では、らい菌の遺伝子を多量に増幅する実験系の解析が不可欠である。本研究で開発したNGS解析を併用したnmPCR法は、少菌型の検体を含め、あらゆる臨床検体から直接らい菌の薬剤耐性とSNP型を同時に同定でき、薬剤耐性の情報を臨床にフィードバックできる。また、本解析法はprimerを変更することで、新規の薬剤耐性変異領域にも対応可能であるため、遺伝子解析へのさらなる応用が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium leprae is the main causative agent of leprosy. Classification of leprosy has multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) groups. Here we developed a rapid method for identification of M. leprae drug resistance and SNP genotype directly from clinical specimens, which includes PB leprosy, by combining nested multiplex PCR with next generation sequence analysis. We used this method to analyze clinical samples from two paucibacillary, nine multibacillary, and six type-undetermined leprosy patients. From these, we amplified drug resistance determining regions (DRDR) of folP1, rpoB, gyrA and gyrB, and regions of 84 SNP-InDels in the M. leprae genome and their sequences were determined. As a result, subtype 1A, 1D, and 3K from these were identified. Three samples of the subtype 3K had folP1 mutation (53 and 55 amino acid residue).

研究分野：細菌学、微生物学

キーワード：らい菌 薬剤耐性 一塩基多型 Nested multiplex PCR 少菌型 他菌型 アンプリコン解析

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、抗酸菌の一種であるらい菌(*Mycobacterium leprae*)によって、主に皮膚と末梢神経が侵される慢性感染症である。世界では、現在でも年間約 20 万人のハンセン病新規患者が報告されている。ハンセン病の病型には少菌型と多菌型があり、多菌型ハンセン病では治療が遅れると、皮疹の増悪や神経痛の悪化などの後遺症が問題となる。一方、少菌型ハンセン病では病変部は局所的であるが、らい菌のスミア検査ではらい菌はほとんど検出されず、診断が困難である。

ハンセン病の治療には、ダブソン、リファンピシン、クロファジミンの多剤併用療法のほか、キノロン薬などが使用される。1964 年にダンプソン耐性らい菌が報告され、1976 年にリファンピシン耐性に報告された。1997 年、多剤耐性らい菌が報告され、らい菌の薬剤耐性化が問題となっている。らい菌の薬剤感受性試験にはマウスのフットパッドアッセイが用いられるが、らい菌をマウスのフットパッドで増殖後に薬剤感受性試験を行うため、判定までに約 1 年半かかる。現在は、薬剤耐性診断には、薬剤耐性に関連した遺伝子の薬剤耐性決定領域(DRDR)における塩基配列の変異有無によって判定される遺伝子変異解析が用いられている。ダブソン耐性を決定する *folP1* では、アミノ酸配列 53 位、または 55 位に変異があると、耐性になることが知られる。そのほか、リファンピシン耐性を決定する *rpoB* やキノロン耐性遺伝子 *gyrA* の変異領域が報告されている。

らい菌の遺伝子型別では、らい菌のゲノム解析の結果から分離地域と SNP 領域の相関関係が得られることが報告されている。SNP 型は 3 つの SNP 領域の塩基をもとに、1 型から 4 型に分類され、さらに 84 ヶ所の SNP 領域を利用して、1A 型から 4P 型までの 16 サブタイプに分類される。

らい菌は人工培養できないうえに、特に少菌型では菌量が少なく、実験動物を用いたらい菌の分離培養には長い時間を要するため、ハンセン病の薬剤耐性診断や SNP 型別は DNA 検査が必須となる。しかし、ハンセン病患者の臨床試料はヒト DNA が多量に含まれるため、直接次世代シーケンシングを行っても、らい菌の DNA シーケンスのリードはほとんど取得できない。

そこで、あらゆる臨床検体から直接らい菌の薬剤耐性と SNP 型を同時に同定できる方法の開発をめざし、Nested multiplex PCR(nmPCR) と NGS 解析を組み合わせた同定方法の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト DNA を多量に含むハンセン病の臨床試料から、らい菌の塩基配列をゲノムワイドに収集し網羅的に解析することを目的とし、らい菌の薬剤耐性変異と膨大な SNP 領域を一括して増幅可能な Nested Multiplex PCR 法とアンプリコン解析を組合せた実験系を構築する。SNP を用いたゲノムワイド関連解析により、薬剤耐性変異と型別の同定、少菌型・多菌型決定因子の探索、株間における遺伝多型の生物学的意義の解析を行う。

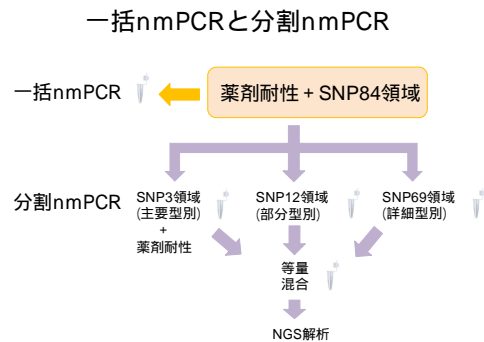
3. 研究の方法

分析サンプルには、2013 年から 2019 年までに国内で得られた臨床検体のうち、外国籍

の方のサンプルを含め、無作為に 17 サンプルを選び、少菌型は 2 サンプル、多菌型では 9 サンプル、病型不明では 6 サンプルの臨床検体を用いた。

薬剤耐性変異と 84 カ所の SNP を標的とした primer を用いて Nested Multiplex PCR を行った。1 段目の Multiplex PCR では、臨床試料から抽出したらい菌 DNA (ヒト DNA を含む) を鋳型として Multiplex PCR を行い、各目的の PCR 産物 (約 250bp のサイズ) を得た。2 段目の Multiplex PCR では、1 段目の Multiplex PCR 産物を鋳型にして Multiplex PCR を行い、各目的の PCR 産物 (約 150bp のサイズ) を得た。得られた PCR 産物を精製後、次世代シーケンスによる解析を行い、各標的の塩基配列を取得した。

解析の結果、増幅の悪い領域があったため、89 ヶ所の標的領域を、薬剤耐性と SNP 型 1 から 4 型まで決定する SNP 主要 3 領域、1 A から 4 P 型のサブタイプを決定するのに最低限必要な SNP12 領域と、詳細に分類するための SNP69 領域に 3 つに分割して、nmPCR を実施した。得られた PCR 産物を等量混合し、NGS 解析を行った。得られたシーケンスかららい菌の薬剤耐性変異と型別を同定した。



4. 研究成果

本研究では、らい菌の薬剤耐性変異と SNP 型を同時に同定できる NGS 解析を併用した nmPCR 法を開発した。開発した本解析方法を用いて、少菌型の臨床検体を含め、すべてのらい菌臨床検体かららい菌の薬剤耐性変異と SNP 型を同定した。

SNP 型別の結果、7 検体が 1A 型、3 検体が 1D 型、7 検体が 3K 型であった。分離地域としては、1A では、ブラジル、バングラデシュ、東チモール、ネパールに由来するものであった。1D 型ではネパールに由来で、3K ではインドネシア、フィリピンおよび日本の由来であった。

また、薬剤耐性に関しては、日本の 3K 型 3 検体で *folp1* に変異が認められた。3 検体のうち、2 検体は *folp1* の 157 番目ヌクレオチド残基で A から G へ置換 (Thr53Ala) され、1 検体は 164 番目のヌクレオチド残基で C から T に置換 (Pro55Leu) されていた。また、全ての検体で *rpoB*、*gyrA*、*gyrB* の DRDR に変異は見られなかった。

この方法により、臨床サンプル中の *M. leprae* の遺伝子解析をより迅速に行うことができると考えられ、増幅解析する *M. leprae* 標的部位を増やすことにより、*M. leprae* 遺伝子解析へのさらなる応用が可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Iwao Yasuhisa, Mori Shuichi, Ato Manabu, Nakata Noboru	4. 巻 59
2. 論文標題 Simultaneous Determination of Mycobacterium leprae Drug Resistance and Single-Nucleotide Polymorphism Genotype by Use of Nested Multiplex PCR with Amplicon Sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00814-821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JCM.00814-21	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩尾泰久、森修一、阿戸学、中田登
2. 発表標題 NGS併用したNested Multiplex PCR法によるらい菌の薬剤耐性および型別の同時同定法
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾泰久、森修一、阿戸学、中田登
2. 発表標題 Nested Multiplex PCR法と次世代シーケンシング解析による、らい菌の薬剤耐性および型別の同時同定法の開発
3. 学会等名 第95回日本ハンセン病学会総会
4. 発表年 2022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	中田 登 (Nakata Noboru) (70237296)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・室長 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------