

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390128

研究課題名（和文） 次世代シーケンサを用いた細菌感染症の迅速診断法の構築

研究課題名（英文） Metagenomic diagnosis of bacterial infections

研究代表者

飯田 哲也（IIDA TETSUYA）

大阪大学・微生物病研究所・特任教授

研究者番号：90221746

研究成果の概要（和文）：

本研究では、次世代シーケンサを用いて急性下痢症の患者糞便検体を解析することにより、病原体の検出や感染症の発症・治癒過程における病原体と細菌叢の経時的動態の網羅的な追跡が比較的簡便な実験手順で解析可能であることを示した。本法は原理的に細菌の種類にこだわらない検出法であり、今後、下痢症のみならずその他の細菌感染症の病原体検出や、腸内を含む人体細菌叢と病原体の動態解析に威力を発揮するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have been applying so-called “high-throughput DNA sequencers” to the analysis of infectious diseases, especially enteric bacterial infections. The approach is in principle a method that does not depend on the type of target pathogens, so that it is possible to analyze various microorganisms with a single common protocol. The approach enables us to conduct an unbiased analysis of dynamics of the pathogen and associated microbiota in human specimens during the course of infectious diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：次世代シーケンサ、細菌感染症、迅速診断法、検出、下痢症

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 配列決定技術の進歩は著しい。特に 2006 年より市販が開始された、いわゆる

「次世代シーケンサ」（Science 311:1544-1546, 2006）は、半日で数十メガベースの DNA 配列を解読する性能を有する。

このような従来のものに比べて格段の性能をもつシーケンサの出現は、さまざまな研究に革新的なインパクトをもたらすことが予想される。特に病原細菌の研究においては、従来、大きなコストと多大な手間を要した細菌のゲノム解析がごく短時間に比較的安価で行えるようになり、ひいては新興・再興感染症の病原体の同定や薬剤耐性菌の耐性獲得機構の解明など、感染症対策につながる有用な知見をより迅速に入手することが可能になると期待される。

研究代表者はこれまで、わが国において主要な食中毒原因である腸炎ビブリオの病原性とゲノムについて、さまざまな角度から研究を行ってきた。特に2003年には腸炎ビブリオの全ゲノム配列を報告し、そこから得られた知見をもとに本菌の病原性に関する新規な因子や機構について明らかにしてきた。また、ゲノム解析で明らかになった腸炎ビブリオの全遺伝子をターゲットとしたDNAマイクロアレイを作製し、臨床分離および環境分離腸炎ビブリオ菌株計22株の遺伝子レパートリを明らかにしてきた。このような過程において、ゲノムの視点から見るのが病原細菌解析の有効なアプローチのひとつであることを確信するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサを用いた細菌感染症の迅速診断法を構築することを目的とした。具体的には、急性下痢症を対象とし、患者より得られた糞便検体から直接細菌ゲノムのDNA抽出を行う。得られたDNAを次世代シーケンサでハイスループットに配列決定し、その配列データを解析することにより、患者糞便中に存在する病原細菌の検出を試みる。本研究では特に、このようなアプローチによる病原細菌検出の方法論（とりわけ、得られる膨大な配列データをいかに効率的に処理し、有用な情報を入手するか）を確立することを第一の目的とした。

3. 研究の方法

急性下痢症を対象とし、患者より得られた

糞便検体から直接細菌ゲノムのDNA抽出を行った。得られたDNAそのもの、あるいは16S rDNAを標的としたPCR産物を次世代シーケンサ（ロッシュ社454 GS platform）でハイスループットに配列決定し、その配列データをblast解析することにより、患者糞便中に存在する病原細菌の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 本研究ではまず、通常の検査では病原体が同定できなかった急性下痢症例の糞便検体を次世代シーケンサを用いて解析し、病原体の直接検出を試みた。急性下痢症を発症した患者から発症4日目（発症時）および3ヶ月後（回復時）に糞便を採取し、-80度で凍結保存した。これら糞便検体からDNAを抽出し、シーケンサGS20（454 Life Sciences）に供した。得られた塩基配列のBLAST解析を行い、トップヒットしてきたDNA配列の由来する生物種をNCBI taxonomyデータベースより検索した。下痢発症時糞便より抽出したDNAから得られた96,941配列のうち156配列が*Campylobacter jejuni*由来のDNA配列にトップヒットしたのに対し、回復時検体については得られた106,327配列のうち本菌にトップヒットするものはなかった。この結果を得たのち、*C. jejuni*をターゲットとしたPCRおよび増菌を含む培養検査を行った結果、下痢発症時糞便中に*C. jejuni*の存在が確認され、本症例が*C. jejuni*によるものであったことが明らかとなった。以上のように次世代シーケンサを用いることにより下痢患者糞便中の病原細菌を直接検出することができた。これは次世代シーケンサを用いたメタゲノミック解析によりヒト臨床検体から細菌病原体（起病菌）を検出した初めての報告となった。

(2) 急性下痢症由来の糞便検体のうち起病菌

が判明している症例について DNA を抽出し、直接シーケンサに供することにより unbiased sequencing を行い、病原菌の検出を試みた。また、海外渡航後急性下痢症を発症した患者から経時的に得た糞便検体より DNA を抽出し、直接シーケンサに供し unbiased sequencing を行った。その結果、下痢患者より得た糞便検体から抽出した DNA を直接 unbiased sequencing することにより、病原体（起病菌）の検出が可能であることを示すことができた。ただし、従来法により病原体（下痢原因菌）が検出されているにもかかわらず、本法ではその病原体が検出できない検体もみられた。この一因として現在の次世代シーケンサのパフォーマンス（解析配列数）が不十分であることが考えられる。今後シーケンサ能力の向上にともないこのような問題点が解消されていくかどうか検討していきたい。また、本研究においては、次世代シーケンサを用いたアプローチにより、感染症の発症・治癒過程における下痢患者糞便中の病原体とフローラの経時的動態を網羅的に追跡することが可能であった。

(3) 急性下痢症の糞便検体を次世代シーケンサを用いて解析することにより、病原体の直接検出を試みるとともに、下痢症の発症・治癒過程における病原体と腸内細菌叢の動態の経時的解析を試みた。

急性下痢症由来の糞便検体で、起病菌が判明しており、また発症・治癒過程において経時的に検体入手ができていた症例（計 9 症例）について既報に従い DNA を抽出し、各抽出 DNA に対し 16S rDNA をターゲットとした PCR を行い、その増幅産物を次世代シーケンサに供した（いわゆる 16S deep sequencing）。その結果、いずれの症例においても、起病菌を検出することができた。さらに経時的に入

手した検体を解析することにより、発症・治癒過程における病原体の消長を観察できたのみならず、病原体以外の腸内細菌叢の動態についても観察が可能であった。

本研究では、次世代シーケンサを用いたメタゲノミックなアプローチにより、病原体の検出や感染症の発症・治癒過程における病原体とフローラの経時的動態の網羅的な追跡が比較的簡便な実験手順で解析可能であることが明らかとなった。従来、培養不能菌や培養困難菌も含めた腸内細菌叢の全貌を解析することは簡単ではなかった。本法は原理的に細菌の種類にこだわらない検出法であり、今後、下痢症のみならずその他の細菌感染症の病原体検出や、腸内を含む人体細菌叢と病原体の動態解析にも威力を発揮するものと期待される。

DNA 配列決定技術は今後もさらに進歩しつつけるものと考えられる。近い将来には現在出ている「第 2 世代シーケンサ」に比べ、コストの点でもスピードでも格段に上回る機械が出てくるであろう。そのようなハイパフォーマンスなシーケンサが普及すれば、現在では多種多様な培地や試薬、PCR プライマーなどを用いて複雑なプロトコールで行われている病原細菌の同定が、DNA シーケンサによる迅速ゲノム解析に取って代わられる日が来るというのあながち夢物語とは言いきれない。本研究はこのような近未来の病原細菌研究ならびに同定診断の先駆けとなるものであり、その礎を作る役割を果たすという意味で意義あるものであると考える。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Nakamura, S., Nakaya, T., and Iida, T. : Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA

sequencing. Exp. Biol. Med. (in press)
2011 (査読有)

2. 飯田哲也 : 次世代シーケンサを用いた細菌感染症のメタゲノミック診断. Medical Technology (2010) 38: 227-229 (査読無し)

3. Nakamura, S., Yang, C.-S., Sakon, N., Ueda, M., Tougan, T., Yamashita, A., Goto, N., Takahashi, K., Yasunaga, T., Ikuta, K., Mizutani, T., Okamoto, Y., Tagami, M., Morita, R., Maeda, N., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Nagai, Y., Horii, T., Iida, T., and Nakaya, T. : Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens using an Unbiased High -throughput Sequencing Approach. PLoS One 4 : e4219, 2009 (査読有)

4. 飯田哲也 : 次世代シーケンサを用いた細菌感染症のメタゲノミック診断. JVM (2009) 62: 819-820 (査読無し)

5. 飯田哲也 : 次世代シーケンサーを用いた微生物・感染症解析. 医学のあゆみ (2009) 231: 180-181 (査読無し)

6. Nakamura, S., Maeda, N., Miron, I.M., Yoh, M., Izutsu, K., Kataoka, C., Honda, T., Yasunaga, T., Nakaya, T., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Horii, T., and Iida, T. : Metagenomic diagnosis of bacterial infections. Emerg. Infect. Dis. 14: 1784-1786, 2008 (査読有)

[学会発表] (計23件)

1. 飯田哲也 : 次世代 DNA シーケンサの細菌感染症への応用. 特別講演 日本細菌学会中国四国支部総会 松山大学 2010年10月16日

2. Iida, T. : Metagenomic analysis of enteric infections. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim: Next

Generation Diagnostics for Infectious Diseases. Penang, Malaysia, Oct. 4-6, 2010

3. Iida, T. : I believe in sequencing. Symposium: Future high -throughput microbiology laboratory. 20th ECCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, April 10-13, 2010

4. Iida, T. : Metagenomic analysis of infectious diseases. The 10th Japan-Korea International Symposium on Microbiology, Pacifico Yokohama, March 26, 2010

5. Iida, T. : Metagenomic analysis of intestinal microbiota in infections. 国際シンポジウム Gut defense and microbial infections, 第83回日本細菌学会総会 パシフィコ横浜、2010年3月27-29日

6. 飯田哲也 : 次世代シーケンサを用いた微生物・感染症解析. 特別講演. 日本微生物資源学会第16回大会、大阪大学银杏会館、2009年6月24-26日

7. Iida, T. : Metagenomic diagnosis of infectious diseases. 12th ISTC-SAC Seminar - Combating Global Infections -, Irkutsk, Russia, September 21-24, 2009

8. Iida, T. : Metagenomic approach for detection of bacterial pathogens. 2008 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology. Seoul KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, Korea, June 26-27, 2008

[図書] (計2件)

1. Nakaya, T., Nakamura, S., Okamoto, Y., Nagai, Y., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Iida, T., and Horii, T.: Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Human Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, Ed. Frans J. de Bruijn. Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, NJ, USA. (in press) 2011

2. 中村昇太、中屋隆明、飯田哲也：次世代シーケンサーを用いた感染症の診断と解析 メタゲノム解析技術の最前線 シーエムシー出版 p. 160-168, 2010

〔その他〕

アウトリーチ活動

・東京大学医科学研究所公開セミナー「ラブラボ」にて「新しい病原体検出法の開発」のタイトルで講演（平成21年8月4日）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 哲也 (IIDA TETSUYA)

大阪大学・微生物病研究所・特任教授

研究者番号：90221746

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし