

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20616

研究課題名（和文）病原微生物のその場メタゲノミックタイピング手法の研究開発

研究課題名（英文）Development of on-site metagenomic typing methods for pathogenic microorganisms

研究代表者

中村 昇太（Nakamura, Shota）

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：90432434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題ではOxford Nanopore Technologies社のシーケンス技術を用いて、感染症発生の現場でオンサイトに解析を行い、その場で網羅的な病原体同定結果が得られるメタゲノミックタイピング手法の研究開発を行った。構築した病原体同定のクラウドコンピューティングシステムを活用し、非結核性抗酸菌の同定を行った。この取り組みにより、従来法では同定不可能であった症例からMycobacterium senrienseという新種の発見や菌種レベルの同定において99.1%の精度を示し、84.5%を亜種レベルで同定したMGIT-seqという手法論を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症対策の初動の基本は病原体同定であり、究極的な病原体同定手法としては感染症が発生しているその場所で、あらゆる病原体の同定を行うことが望ましい。そこで新たにポータブル型の次世代シーケンス技術による非結核性抗酸菌（NTM）の同定システムの構築を行った。本研究で得られた方法論であるMGIT-seqは菌種レベルの同定において99.1%の精度を示し、84.5%を亜種レベルで同定した。このMGIT-seqは、非結核性抗酸菌の網羅的な種同定を達成し、臨床現場における単一の検査による亜種同定と肺NTM症治療戦略の決定に適用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a metagenomic typing method that can be analyzed on-site at an infectious disease outbreak to achieve comprehensive pathogen identification. We used the portable sequencing devices from Oxford Nanopore Technologies and constructed a cloud computing system for the identification of Non-tuberculous Mycobacterium. This effort led to the discovery of a novel species, Mycobacterium senriense, from a case that could not be identified by conventional methods and the establishment of MGIT-seq methodology which demonstrated 99.1% accuracy at the species level and 84.5% accuracy at the subspecies level.

研究分野：感染症内科学

キーワード：感染症 メタゲノミクス 病原細菌 抗酸菌 微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界では未だに収束しないエボラ出血熱の流行やアフリカで広がるコレラ感染など多くの感染症の問題を抱えている。我が国においても風疹や麻疹の再流行や、動物における鳥インフルエンザウイルスや豚コレラウイルスの流行が問題視されており、病原体同定や日々の疫学調査能力の向上が求められている。感染症対策の初動の基本は病原体同定であり、究極的な病原体同定手法としては感染症が発生しているその場所(オンサイト)で、あらゆる病原体の同定を行うことが望ましい。これまでに小型な PCR 機器の開発や LAMP 法などのオンサイトな解析手法論が開発されてきたものの PCR がベースであるためゲノム情報の網羅性が低く正確な同定を行うことはできない。また現在普及している次世代シーケンサーはメタゲノム解析により網羅的に病原体を探索できる可能性があるが、機器が大型であるため感染症の発生現場その場での解析は不可能であった。そこに次世代シーケンス技術の発展により、新たにポータブル型の次世代シーケンス技術である Oxford Nanopore Technologies (ONT)社の MinION デバイスが 2014 年に登場し、その 5 年後にはバージョン R10 フローセルのリリースによってシーケンス精度が大幅に向上し、病原体検出や遺伝子マーカー解析に実用化の目処が立ちつつある。

2. 研究の目的

本研究課題では、この ONT 社のシーケンス技術を用いて、感染症発生の現場でオンサイトに解析を行い、その場で網羅的な病原体同定結果が得られるメタゲノミックタイピング手法の研究開発を行う。これまでも ONT 社はオンサイト解析を強調してきたが、実際にはそのほとんどがその場でシーケンスだけを行ったのちに、研究室にシーケンスデータを持ち帰り大型計算機による解析が行われるという、オンサイト解析とは程遠いのが現状である。こうした背景には、NGS から得られるデータがあまりに膨大であるが故に、処理しうるだけのネットワークおよび計算基盤が確立できていないことが挙げられる。

3. 研究の方法

MinION は小型携帯機であるが、そのデータ量は膨大であり 1 回のシーケンスで最大 500GB から 1TB の生データが出力され、最終的に 20Gb 程度の遺伝配列情報が取得可能である。こうしたデバイスが遺伝情報を出力する IoT 機器として広く病院やフィールド調査で普及した場合、課題となってくるのはいかにしてデータをやりとりし、また解析処理を行うかという点である。この課題を解決するために本研究では、シーケンス作業と解析作業を分け、シーケンス作業は出来るだけ臨床現場に近い場所で実施し、得られたゲノムデータはリモートで大型計算機に自動で送信し解析後、臨床現場に結果を即時に返すようなクラウドコンピューティングを活用したシステム開発を行った。

4. 研究成果

構築した病原体同定のクラウドコンピューティングシステムを活用し、下記に示したような非結核性抗酸菌 (Non-Tuberculous Mycobacteria : NTM) 同定の成果を得た。

(1) 新種 *Mycobacterium senriense* の発見

慢性閉塞性肺疾患のある 74 歳の男性が、数日間続く発熱と呼吸困難のため受診となった。慢性呼吸器症状が繰り返し増悪し、複数回の入院を要した既往があった。胸部 CT では、左上葉に圧密を伴う両側肺気腫、左下葉に軽度の気管支拡張が認められた。喀痰検体は、*M. tuberculosis*、*M. avium* および *M. intracellulare* の抗酸菌塗抹および TRC 反応は陰性であった。しかし、マイコバクテリア増殖インジケーターチューブによる 1 週間の培養試験では、マイコバクテリアが陽性であった。培養したマイコバクテリアはアキュプロープシステムで *M. avium* complex の陽性結果を示したが、コバスアンプリコアシステムや DNA-DNA ハイブリダイゼーションアッセイなどの従来の方法ではその種/亜種を同定できなかった。構築したクラウドシステムにより解析した結果、*Mycobacterium colombiense* と近縁であることが示されたが、高スコアでマッチするコアゲノムプロファイルが見つからなかった。これは用いているデータベース内に情報がなく、新種である可能性を示している。このため我々は培養された株 (TY59) の全ゲノム解析を行い、完全長ゲノム配列を決定した。このゲノムから算出した DNA G+C 含量は 67.08 mol% であった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いた系統解析の結果、この菌株は *M. avium* complex のメンバーおよび近縁種に類似していることが示された。TY59 株は、*Mycobacterium colombiense* (99.80% 配列類似性)、*Mycobacterium vulneris* (99.74% 配列類似性)、*Mycobacterium timonense* (99.54% 配列類似性)、*Mycobacterium avium* subsp. *avium* (99.54% 配列類似性)、*Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (99.54% 配列類似性) の各タイプ株と最も高い 16S rRNA 遺伝子配列類似性を示した。16S-23S rRNA 遺伝子の ITS と *rpoB* 遺伝子の配列解析では、16S rRNA 遺伝子と同様の結果が得られた。TY59 株に最も近い種は *M. colombiense* と *M. vulneris* で、ITS の同一性は 97.90~98.25%、

rpob の同一性は 96.4~96.6%であった。65kDa の熱ショック蛋白質 (hsp65) は *M. vulneris* DSM 45247T、*M. colombiense* CECT 3035T、*M. avium* subsp. *silvaticum* ATCC 49884T と 72.4-74.2%の同一性で異なっていた。もう一つの類似性指標である平均ヌクレオチド同一性 (ANI) 指数は、175 種の NTM のタイプ株の中で *M. vulneris* との一致率が 93.4%と最大値を示した (表 1)。ANI 値が 95%を下回ったことから TY59 株は新種であることが示された。この種の名称は、*Mycobacterium senriense* sp. nov. と提案した。

(2) MGIT 早期培養検体からの抗酸菌同定

標準的な臨床プロトコルと比較し、MGIT 早期培養検体からのダイレクトメタゲノミックシーケンス (MGIT-seq) による包括的な亜種レベルの同定および薬剤耐性予測の臨床的有用性を評価するために前向き研究を実施した。2021 年 4 月から 2022 年 5 月にかけて、大阪刀根山医療センターで肺非結核性抗酸菌症 (NTM-PD) と診断された、または NTM-PD が疑われ、書面によるインフォームドコンセントを得た患者検体を収集した。登録された患者総数は 138 人であったが、最終的なコホートは 116 人の患者で構成された。全 116 例の MGIT 培養検体は、TRC 反応を用いて結核菌陰性であることが確認され、標準的な臨床的同定および薬剤感受性試験とともに、MinION を用いた遺伝情報解析を行った。標準的な臨床プロトコルには、TRC、MALDI-TOF MS、マルチプレックス PCR、クロマトグラフィー検出が試行された。

MGIT 培養陽性株は、まず TRC を用いて *M. avium* と *M. intracellulare* を調べた。その結果、67 株 (67/116; 57.8%) が *M. avium* 陽性、27 株 (27/116、23.3%) が *M. intracellulare* 陽性であった。残りの 22 株は、7H11 寒天培地で 3~7 日間培養した後、MALDI-TOF MS に供され、*M. abscessus* (n=8) *M. kansasii* (n=1) *M. lentiflavum* (n=1) *M. lentiflavum* (n=1) *M. lentiflavum* (n=2) *M. peregrinum* (n=2) *M. avium* (n=1) *M. paragordoniae* (n=1) *M. gordoniae* (n=1) *M. fortuitum* complex (n=2) および *M. chelonae* (n=1) と同定された。3 株は MALDI-TOF MS では種同定ができなかった。*M. abscessus* の 8 分離株は、*M. abscessus* subsp. *abscessus*、*M. abscessus* subsp. *bolletii*、*M. abscessus* subsp. *massiliense* を区別するために、マルチプレックス PCR とクロマトグラフィー検出を用いてさらに解析した。5 株は *M. abscessus* subsp. *massiliense*、3 株は *M. abscessus* subsp. *abscessus* および *M. abscessus* subsp. *bolletii* と同定された。これらの標準的な臨床プロトコルを用いて、113 株 (97.4%) を種レベルで、8 株 (6.9%) を亜種レベルで分類した。

次に MGIT-seq 解析を実施したところ、116 分離株すべて (100%) が種レベルで同定され、98 分離株 (84.5%) が亜種レベルで同定された。MGIT-seq と標準臨床プロトコルの結果の不一致は 4 症例で認められ、標準臨床プロトコルの結果では 3 症例が未同定 (No.53、71、93) で、1 症例が *M. gordoniae* (No.85) と同定された。MGIT-seq では、未同定の 3 症例で *M. gordoniae* (No.53) *M. szulgai* (No.71) *M. paragordoniae* (No.93) が同定された。標準的な臨床プロトコルにおける *M. gordoniae* の症例 (No. 85) は、MGIT-seq により *M. paragordoniae* と同定された。この結果をまとめると、MGIT 培養陽性であった合計 116 人の患者の前向き研究において、MGIT-seq は菌種レベルの同定において 99.1%の精度を示し、84.5%を亜種レベルで同定した。この研究で確立された MGIT-seq は、非結核性抗酸菌の網羅的な種同定を達成し、臨床現場における単一の検査による亜種同定と NTM-PD 治療戦略の決定に適用できる可能性がある。

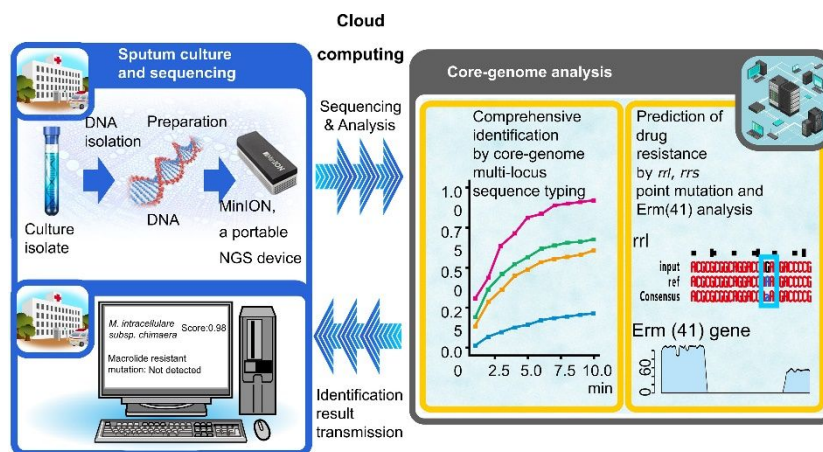


図 1.クラウドコンピューティングシステムのイメージ。病院の検査室等で MinION によるシーケンスを実施し、出力されたデータは自動的にクラウドシステムに転送され大型計算機によって高速解析が行われ、同定結果のみが病院に送られる。実際に実施した同定計算時間は 30 分から 2 時間程度であった。

< 引用文献 >

Abe Y, Fukushima K, Matsumoto Y, Niitsu T, Nabeshima H, Nagahama Y, Akiba E, Haduki K, Saito H, Nitta T, Kawano A, Tanaka M, Matsuki T, Motooka D, Tsujino K, Miki K, Nakamura S, Iida T, Kida H. *Mycobacterium senriense* sp. nov., a slowly growing, non-scotochromogenic species, isolated from sputum

of an elderly man. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2022 May;72(5).

Fukushima K, Matsumoto Y, Matsuki T, Saito H, Motooka D, Komukai S, Fukui E, Yamuchi J, Nitta T, Niitsu T, Abe Y, Nabeshima H, Nagahama Y, Nii T, Tsujino K, Miki K, Kitada S, Kumanogoh A, Akira S, Nakamura S, Kida H. MGIT-seq for the Identification of Nontuberculous Mycobacteria and Drug Resistance: a Prospective Study. *J Clin Microbiol.* 2023 Apr 20;61(4):e0162622.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Fukushima K, Matsumoto Y, Matsuki T, Saito H, Motooka D, Komukai S, Fukui E, Yamuchi J, Nitta T, Niitsu T, A, Nabeshima H, Nagahama Y, Nii T, Tsujino K, Miki K, Kitada S, Kumanogoh A, Akira S, Nakamura S, Kida H	4. 巻 61
2. 論文標題 MGIT-seq for the Identification of Nontuberculous Mycobacteria and Drug Resistance: a Prospective Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0162622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jcm.01626-22	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 -

1. 著者名 Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Saito Haruko, Abe Yuko, Akiba Eri, Haduki Kako, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Tanaka Michio, Hattori Yumi, Kawasaki Takahiro, Matsuki Takanori, Shiroyama Takayuki, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Mori Masahide, Kitada Seigo, Nakamura Shota, etc	4. 巻 28
2. 論文標題 Chronic Pulmonary Disease Caused by Tsukamurella toyonakaense	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2807.212320	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 -

1. 著者名 Abe Yuko, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Niitsu Takayuki, Nabeshima Hiroshi, Nagahama Yasuharu, Akiba Eri, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Tanaka Michio, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Kida Hiroshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Mycobacterium senriense sp. nov., a slowly growing, non-scotochromogenic species, isolated from sputum of an elderly man	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 5378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.005378	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 -

1. 著者名 Matsumoto Yuki, Nakamura Shota	4. 巻 無し
2. 論文標題 Rapid and Comprehensive Identification of Nontuberculous Mycobacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 247 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2996-3_17	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 Mohsin Mashkoor, Tanaka Kaori, Kawahara Ryuji, Kondo Shinji, Noguchi Hideki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Khong Diep Thi, Nguyen Thang Nam, Hoang Trong Nang, Yamamoto Yoshimasa	4. 巻 21
2. 論文標題 Whole-genome sequencing and comparative analysis of the genomes of Bacteroides thetaiotaomicron and Escherichia coli isolated from a healthy resident in Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 65 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.02.034	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 該当する
1. 著者名 Hiramatsu Yukihiko, Suzuki Koichiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Expression of small RNAs of Bordetella pertussis colonizing murine tracheas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12791	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 -
1. 著者名 Al kadi Mohamad, Jung Nicolas, Ito Shingo, Kameoka Shoichiro, Hishida Takashi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Okuzaki Daisuke	4. 巻 20
2. 論文標題 UNAGI: an automated pipeline for nanopore full-length cDNA sequencing uncovers novel transcripts and isoforms in yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Functional & Integrative Genomics	6. 最初と最後の頁 523 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10142-020-00732-1	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 -
1. 著者名 Shimizu Kentaro, Takahashi Ayumi, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Tomono Kazunori, Ogura Hiroshi, Shimazu Takeshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Fecal Gram staining of phagocytosed bacteria to differentiate methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.05.021	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 Yamamoto Seiji P., Motooka Daisuke, Egawa Kazutaka, Kaida Atsushi, Hirai Yuki, Kubo Hideyuki, Motomura Kazushi, Nakamura Shota, Iritani Nobuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel human reovirus isolated from children and its long-term circulation with reassortments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58003-9	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 -

1. 著者名 Harada Tetsuya, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yamamoto Yoshimasa, Yamaguchi Takahiro, Kawahara Ryuji, Kawatsu Kentaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Detection of Genetic Elements Carrying vanA in Vancomycin-Resistant Enterococcus saigonensis VE80T Isolated from Retail Chicken Meat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 772 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2020.2827	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 -

1. 著者名 Umeda Kaoru, Nakamura Hiromi, Fukuda Akira, Yamaguchi Takahiro, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Kawahara Ryuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Molecular characterization of blaKHM-1 encoding plasmid in an Enterobacter hormaechei subsp. hoffmannii isolate from blood culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227605	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 -

1. 著者名 Yasugi Mayo, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Miyake Masami	4. 巻 61
2. 論文標題 Phosphorothioation of foreign DNA influences the transformation efficiency in Clostridium perfringens NCTC8239	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102085 ~ 102085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2019.102085	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 Yasugi Mayo, Hatoya Shingo, Motooka Daisuke, Matsumoto Yuki, Shimamura Shunsuke, Tani Hiroyuki, Furuya Masaru, Mie Keiichiro, Miyake Masami, Nakamura Shota, Shimada Terumasa	4. 巻 16
2. 論文標題 Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC -lactamase-producing Escherichia coli isolates from companion dogs in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0246482	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 -

1. 著者名 Umeda Kaoru, Nakamura Hiromi, Fukuda Akira, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yasui Yoshinori, Yoshida Hideki, Kawahara Ryuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Genomic characterization of clinical Enterobacter roggenkampii co-harboring blaIMP-1- and blaGES-5-encoding IncP6 and mcr-9-encoding IncHI2 plasmids isolated in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 220 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.11.028	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村昇太
2. 発表標題 非結核性抗酸菌の迅速その場同定
3. 学会等名 第6回抗酸菌研究会 (招待講演)
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------