

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07375

研究課題名（和文）ナノポア・シーケンサーを用いた網羅的な病原体検査法の実証

研究課題名（英文）Verification of technology for comprehensive detection of pathogens using nanopore sequencers

研究代表者

前田 卓哉（Maeda, Takuya）

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：SARS-CoV-2感染拡大時期には、COVID-19患者検体を網羅的に解析し、他の病原体の共感染が病態に与える影響を検証した。結果、すべての重症および中等症患者でもウイルス共感染は検出せず、重症化への関与は否定された。なお、重症および中等症42名のうち16例から24の細菌感染症が確認されたが、いずれも肺炎の増悪因子にはなり得なかった。本システムは、新規の抗菌薬耐性メカニズムの解明にも貢献した。血液培養から同定したDysgonomonas capnocytophagoidesをMinion Flongleを用いて解析し、新規Class B MBL遺伝子blaDPC-1の関与を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症を早期に診断し、適切な治療法を選択するためには、なにより病原体の正確な診断が重要である。一方、従来の検査技術では、想起される病原体に関する生物学的もしくは遺伝学的な情報がなければ、正しい診断は不可能であった。ところが、本研究で検証した網羅的な遺伝子増幅技術、および、ゲノムシーケンス技術を臨床検査に応用することで、事前の情報が無い新規病原体が覚知でき、新規の抗菌薬耐性菌の同定も実現できる。本研究では、医療機関において実際の臨床検体を活用し、これらのパイプラインの実用性を実証したことに意義があるといえる。

研究成果の概要（英文）：During the SARS-CoV-2 infection, we comprehensively analyzed COVID-19 patient specimens to determine the effect of co-infection with other pathogens on pathogenesis. As a result, viral co-infection was not detected in all severely and moderately ill COVID-19 patients, and also the possibility that this played a role in the severity of the disease was ruled out. Twenty-four bacterial infections were identified in 16 of 42 severely and moderately ill COVID-19 patients, but none of them could be an exacerbating factor for pneumonia. This system also contributed to the elucidation of novel antimicrobial resistance mechanisms. Analysis of Dysgonomonas capnocytophagoides identified from blood cultures using Minion Flongle showed the involvement of a novel class B MBL gene, blaDPC-1.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：網羅的遺伝子検査 COVID-19 遺伝子解析 MinION

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノムシーケンス技術を駆使した網羅的な病原体検査法は、特定の病原体を想起して検査を行う必要がない。しかも、限られた検体から数多くの情報をリアルタイムに入手できることから、機動力に優れた次世代検査法として期待されていた。さらに、ゲノムワイドな解析は、疾病の重症化因子や抗菌薬に対する耐性情報が入手できるほか、ゲノム疫学調査にも使用可能である。研究開始当初、収束が見えない新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) と「共存する」With コロナの時代であり、感染症領域におけるゲノム診断のニーズは極めて高まっていた。さらに、COVID-19 の重症化には、さまざまな病原体の混合感染が原因となる可能性が報告されていた (Langford BJ, et al. Clin Microbiol Infect, 2020)。そのため、有効な治療薬がない COVID-19 の重症化を阻止し、患者予後を向上させるためには、共感染する病原体を的確に補足し、適切な治療を速やかに導入することが極めて重要であると考えられていた。持ち運び可能なナノポア・シーケンサー「MinION」は、扱うデータ量を 1/4 に低減し、より小型で安価な「Flongle」へと逆進化した。なにより、USB 接続したノート型 PC で制御可能であり、大型装置の整備を必要としない。Flongle によるゲノム解析の「スペック・ダウン」は、臨床検査への導入への障壁を低減させ、次世代の検査技術の候補の一つに躍り出すことができた。ゲノムワイドな検査法は、検体種や標的微生物の生物特性を考慮する必要がなく、さまざまな病態・病原体に共通プロトコルで対峙することができる。データ解析のパイプラインを構築し、有用性が実証できる共通の解析プロトコルを確立することは、「With コロナ」における緊急の課題である。

2. 研究の目的

研究代表者らのグループは、いち早くナノポア・シーケンサー (MinION) によるゲノム診断と網羅的な病原体解析に着目し、臨床応用の可能性について検証を重ねてきた。本研究では、過去に培ったノウハウを集結させ、統一したシーケンス・アルゴリズムと、情報解析のパイプライン構築を目指すことを目的とし、さまざまな臨床検査に応用し、その有用性を実証することを目指した。本研究の成果は、患者の迅速な診断、治療選択、予後推測にとどまらず、病原体のメタゲノム解析を実現させ、臨床現場におけるテーラーメイド医療に貢献できると考えた。

3. 研究の方法

- COVID-19 患者から取得した鼻咽頭拭い液中に含まれる病原体ゲノムを網羅的に解析することで、共感染する病原体の病態への関与を検証した。さらに、ゲノム解析のパイプラインを構築し、COVID-19 患者の混合感染をモニタリングする体制を構築した。当院で診療し、凍結保存していた COVID-19 患者検体 (9,641 検体) のうち、最終的に中等症もしくは重症 COVID-19 と診断された患者の初回採取検体 42 検体を解析の対象として用いた。大学病院 IRB による承認後、患者背景 (年齢、性別、基礎疾患など) の診療情報もあわせて解析した。
- MinION シーケンサーを用いた臨床検査への実証試験として、構築したパイプラインを活用し、薬剤耐性機序の解明に取り組んだ。解析には、慢性腎不全患者から採取した血液から分離培養した菌株を用い、その耐性機序の解明を目指した。本菌は、MALDI-TOF MS にて *Dysgonomonas capnocytophagoioides* の可能性までが同定されており、広範囲の β -ラクタム系抗菌薬の他、クラリスロマイシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、クリンダマイシンへの耐性を確認したほか、クラス B のメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) 産生が示唆された。*D. capnocytophagoioides* は幅広い抗菌薬耐性が報告されるが、その耐性機序の詳細は未だ解明されていない。本研究により構築した解析システムを用い、Minion (Flongle, Oxford) および iSeq100 (Illumina) を用いてゲノム解析を実施した。

4. 研究成果

- 当院で診療した中等症・重症の COVID-19 患者から取得した鼻咽頭拭い液から RNA を抽出した。その後、網羅的な病原体検出を試みたが、SARS-CoV-2 以外のウイルスの共感染を検出することはできず、重症化因子になりうるとする仮説は否定された。なお、診療録の後方視的解析の結果、42 名のうち 16 例 (38.1%) から 24 の細菌感染症の併発を確認した (Table)。入院から細菌感染症の診断までの中央値は 6.5 日であり、敗血症 5 例、誤嚥性肺炎 4 例、カテーテル関連血流感染症 4 例、尿路感染症 3 例、二次性肺炎 3 例、肺アスペルギルス症 2 例、などがあつた。いずれも、偶発的な混合感染であると考えられ、COVID-19 の病態に影響する可能性は否定的であった。

Table. Bacterial co-infections in patients with severe COVID-19

Disease	n (%) [median, IQR]	Bacterial species isolated
Ventilator-associated pneumonia	1 (6.3%) [14.0 days]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Aspiration pneumonia	4 (25.0%) [-3.0 days, IQR -10.5, 1.0]	Not available (n=1)
Bacteremia/sepsis	5 (31.3%) [10.0 days, IQR (7.0, 10.0)]	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (n=1), <i>K. pneumoniae</i> (n=1), <i>Streptococcus anginosus</i> (n=1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)
Catheter-related bloodstream infection	4 (25.0%) [8.0 days, IQR 4.8, 13.5]	<i>Staphylococcus caprae</i> [MRCNS] (n=1), <i>S. anginosus</i> (n=1), <i>Staphylococcus aureus</i> [MSSA] (n=1), <i>Staphylococcus epidermidis</i> [MRCNS] (n=2), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> [MRCNS] (n=1)
Urinary tract infection	3 (18.8%) [7.0 days, IQR 4.0, 8.5]	<i>Escherichia coli</i> [ESBL] (1), <i>P. aeruginosa</i> (n=1), <i>K. variicola/pneumoniae</i> (n=1)
Secondary pneumonia	3 (18.8%) [3.0 days, IQR 2.0, 5.5]	<i>P. aeruginosa</i> (1), Not available (n=2)
Pulmonary aspergillosis	2 (12.5%) [-1.0 days, IQR -4.5, 2.5]	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Iliopsoas abscess	1 (6.3%) [17.0 days]	Not available (n=1)

This table demonstrates the frequency of occurrence of each co-infection, as well as the median date of onset based on date of admission. In the case of an infectious disease that had developed before admission, the date of onset is indicated by a minus sign. CRBSI, catheter-related bloodstream infection; ESBL, extended spectrum beta-lactamase; IQR, interquartile range; MRCNS, methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci; MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*.

b. シーケンス解析の結果、配列リードは4,781,552 bp および2,784 bp にアセンブルされ、それぞれを環状ゲノムおよび環状プラスミドと同定し、データベースに登録した (AP028867, AP028868)。16S rRNA 解析では、*D. capnocytophagoides* DSM 22835 株 (NR_113133) に対し、97%のカバレッジと 99.8%の同一性を示した。DFAST4 および ResFinder では MBL gene (blaDYB-1) と、その上流に Bacteroides promoter を確認した。アミノ酸解析では *Bacteroides fragilis* CfiA と 51%の相同性をもち、Zn²⁺リガンドを確認した (Fig)。最後に、blaDPC-1 の ORF 全長を pHSG398 に組み込み、TOP10 に形質転換したのち各種抗菌薬への感受性変化を検証した。その結果、カルバペナムを含む β-ラクタム系抗菌薬への MIC 増加を認めたことから、本菌が広域 β-ラクタム系抗菌薬に耐性を示したのは、Class B MBL 遺伝子 blaDPC-1 が関与することを明らかにした。なお、成果報告書作成時において、本研究の成果を海外学術雑誌に投稿中である。

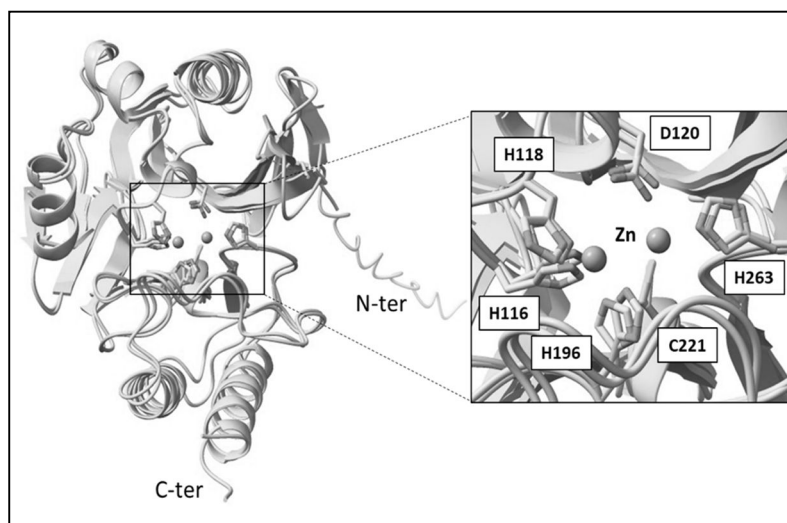


Figure. Class B MBL に共通する Zn²⁺リガンド構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野寺梓, 今井一男, 折原悠太, 川村利江子, 武内信一, 前田卓哉
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症検査で採取した鼻咽頭ぬぐい液を用いた新たな重症化因子の検討
3. 学会等名 第70回日本医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田卓哉
2. 発表標題 SARS-CoV-2の遺伝子検査、抗原検査の手法、抗体検査の解釈と診断への応用
3. 学会等名 第94回 北海道医学検査学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田卓哉
2. 発表標題 総括 新型コロナ 新型コロナウイルスをとりまく臨床検査の現状
3. 学会等名 第96回 日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大金佳菜, 今井一男, 折原悠太, 小棚雅寛, 松崎奈那子, 河村亨, 戸叶美枝子, 樽本憲人, 前田卓哉
2. 発表標題 鼻腔拭い液を用いた抗原定性検査の有効性の検証
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田卓哉
2. 発表標題 感染症の血清診断と遺伝子検査 感染症の遺伝子検査の現状と展開
3. 学会等名 第41回 関東医真菌懇話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小棚雅寛, 今井一男, 市村辰太郎, 前田卓哉
2. 発表標題 Dysgonomonas capnocytophagoi desにおける新規Class Bメタロ -ラクタマーゼ遺伝子の同定
3. 学会等名 第35回 日本臨床微生物学会
4. 発表年 2023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	樽本 憲人 (TARUMOTO NORIHITO) (00746993)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	

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