

令和 6 年 7 月 2 日現在

機関番号：84425

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08194

研究課題名（和文）MLST法を利用した肺非結核性抗酸菌症の網羅的迅速診断システム開発

研究課題名（英文）Comprehensive and rapid diagnosis of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease by using multi-locus sequence typing

研究代表者

木田 博（Kida, Hiroshi）

独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター（臨床研究部）・独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター・呼吸器内科部長

研究者番号：80512988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺NTM症診療において喀痰抗酸菌培養・菌種同定・薬剤感受性検査は複雑な作業行程からなる労力・時間を要する検査である。研究協力者らが開発した新規MLST法網羅的NTM菌種同定システム（mlstverse法）を肺NTM症診療に位置付けることが本研究課題の第一目的であった。我々はmlstverseを液体培養（MGIT）と連動させ、薬剤感受性予測検査を追加したMGIT-seq法の有用性を前向き臨床試験で示した。またmlstverse法で5つの新種NTM菌を発見した。さらにNALC処理後の喀痰検体を培養せず直接菌種同定が可能なNALC-seq法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MGIT-seq法は抗酸菌菌種同定、薬剤感受性検査を精緻化、時短化するだけでなく、検査技師人材不足に悩む病院でもインターネットに接続可能なら実施可能であるため、肺NTM症診療の均てん化に貢献する。また省力化によって、全ての病院で抗酸菌菌種同定、薬剤感受性検査が普及し、例えばマクロライド耐性可塑性など、感染症学における重要なテーマを提供するようになる。mlstverseによる新種発見が細菌学の裾野を広げることは言うまでもない。NALC-seq法による培養を経ない菌種同定検査法はさらなる時短化とともに培養検査よるバイアスフリーの気道感染菌情報を提供し、呼吸器感染症学におけるブレイクスルーを起こす。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of NTM pulmonary disease (PD), species identification and drug susceptibility testing following sputum acid-fast bacillus culture involve complex procedures that are labor-intensive and time-consuming. The primary objective of this research project was to position the newly developed comprehensive NTM species identification system (mlstverse) within the clinical practice of NTM PD treatment. We linked mlstverse with liquid culture (MGIT-seq) and demonstrated the utility of the MGIT-seq method, which includes drug susceptibility prediction, in a prospective clinical trial. Additionally, we discovered five new NTM species using the mlstverse method. Furthermore, we successfully developed the NALC-seq method, which allows for direct species identification from sputum specimens treated with NALC without the need for culture.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：MGIT-seq法 NALC-seq法 MLST法 mlstverse target capture sequence マクロライド耐性肺MAC症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺 NTM 症診療においては、診断時に菌種同定検査、化学療法開始前、及び 6 か月治療しても排菌が陰性化しない場合には菌種同定とマクロライド、アミカシンの薬剤感受性検査を行う必要がある¹⁾。しかし NTM 菌の菌種同定検査・薬剤感受性検査は複雑な作業行程からなる労力・時間を要する検査であり、検査技師の人手不足より必要な検査が実施できない地域、病院があると考えられる。また NTM 菌は 200 種存在、毎年のように新種が報告されているが、今日、臨床的に同定可能な菌種は限定的である。

共同協力者である中村らは先行研究において新規 MLST 法、網羅的 NTM 菌種同定システム (mlstverse 法)を開発した。mlstverse は 184 遺伝子配列の組み合わせを用いた新規 MLST 法で亜種レベルの網羅的 NTM 菌種同定を行うソフトである²⁾。クラウド上に置かれた mlstverse にポータブル次世代シーケンサー MinION(Oxford Nanopore Technologies 社)で解読した菌ゲノム配列を、インターネットを介して送付すると、解析結果はリアルタイムで返送されるシステムになっている²⁾。

2. 研究の目的

(1) mlstverse 法を肺 NTM 症診療に位置付ける。液体培養検査(MGIT 法, mycobacteria growth indicator tube 法)に mlstverse を連結し、さらに薬剤(マクロライド、アミカシン)感受性検査を追加報告する MGIT-seq 法を開発する。

(2) mlstverse を使って肺 NTM 症を引き起こす新種の NTM 菌を発見し細菌学の裾野を広げる。

(3) MGIT-seq 法は肺 NTM 症診療に変容を起こせるか? クリニカルクエスチョン「マクロライド耐性肺 MAC 症に(immuno-modulatory 効果を期待して)マクロライド継続内服することは有効か?」に対する問題提起を行う。

(4) 培養検査を経ず、NALC(N-アセチル-L-システイン)処理後の喀痰検体を直接 target capture sequence (NALC-seq)し、mlstverse で解析する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 2021 年 4 月~2022 年 5 月 NHO 大阪刀根山医療センターに受診した肺 NTM 症患者(疑い例含め)を書面による同意取得後、前向きに登録した。採取した喀痰より MGIT 培養を行い陽性的場合、MGIT-seq 法と従来法と比較した。MGIT-seq 法におけるマクロライド薬剤感受性予測は、rrl 遺伝子 2058 及び 2059 位 mutation、アブセッサス菌の場合 erm(41)遺伝子 truncation、T28C の有無により判定した。アミカシン薬剤感受性予測は rrs 遺伝子 1408 位 mutation の有無により判定した。本研究は NHO 大阪刀根山医療センター臨床研究審査委員会の承認を得て行った(承認番号 TNH-R-2020020)。

(2) 現在の臨床検査で同定可能な NTM 菌種は限定的であり、日常臨床において患者検体から培養される NTM 菌株の一部は同定不能菌株としてストックされている。我々は当院細菌検査室にストックされていた同定不能菌株を mlstverse で解析し、希少菌種或いは新種と判断された場合、症例の特徴を見直した。新種と判断された菌株は HiSeq2500 (Illumina)を用いた全ゲノムシーケンス、in vitro の性状検査を行い、大阪大学微生物病研究所及びパスツール研究所に菌株寄託を行った。本研究は NHO 大阪刀根山医療センター臨床研究審査委員会の承認を得て行った(承認番号 TNH-2019063)。

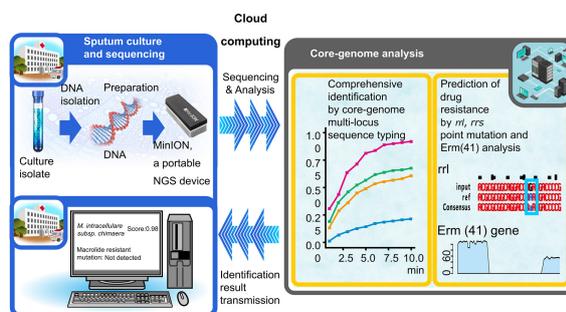
(3) NHO 大阪刀根山医療センターにて 2012 年 1 月~2022 年 6 月の期間中にマクロライド耐性肺 MAC 症(MR-MAC-PD)と診断された症例を登録し、MR-MAC-PD 診断後の喀痰培養菌株におけるマクロライド感受性の経時的変化、MR-MAC-PD 診断後のマクロライド内服継続が喀痰培養菌株におけるマクロライド感受性の経時的変化、生存に与える影響、をレトロスペクティブに検討した。また MR-MAC-PD 診断時及び直近の喀痰培養菌株の同一性を VNTR 法、全ゲノムシーケンスで比較した。本研究は NHO 大阪刀根山医療センター臨床研究審査委員会(承認番号 TNH-2019063)、大阪大学微生物病研究所生命科学研究倫理委員会(承認番号 583-2)の承認を得て行なった。

(4) NHO 大阪刀根山医療センターに通院中の肺 NTM 症及び肺結核患者を登録した。NALC 処理後の喀痰検体より DNA を抽出した。ヒト DNA の影響を回避するため、特注で作成した RNA プローブを用いた SureSelect Low Input Target Enrichment System (Agilent Technologies Inc)でマイコバクテリア由来 DNA を濃縮した。次世代シーケンサー、MGI DNBSEQ-G400 (MGI)、で解読した配列を、mlstverse 法を用いて分析した。本研究は NHO 大阪刀根山医療セ

ンター臨床研究審査委員会の承認を得て行った(承認番号 TNH-R-2020020)。

4. 研究成果

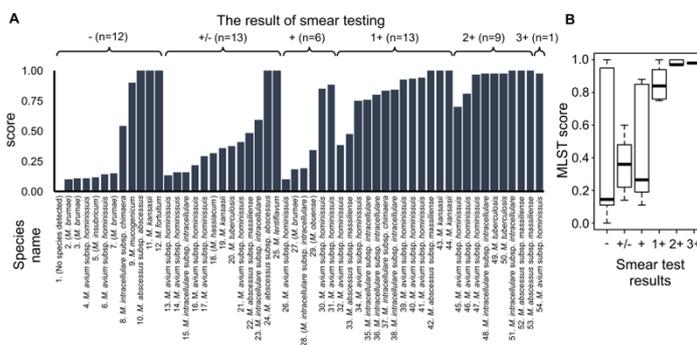
(1) 138 名登録、MGIT 培養陰性 22 名を除外し 116 名を解析した。MGIT-seq 法では、ほぼ全例(99.1%)で菌種同定が可能であり、さらに 90%の症例で従来法では得ることができなかった亜種レベルの情報を得ることができた。薬剤感受性予測はマクロライドで感度 95%、特異度 98%。アミカシンでは感度 50%、特異度 100%であった。MGIT-seq 法では解析結果はクラウド計算機からリアルタイムで得られるため、また病院の検査室に必要な機材は最小限であり、臨床現場において迅速・網羅的な亜種レベルの同定と正確な薬剤耐性変異予測が可能になる。以上の結果を論文報告した(Fukushima et al., 2023)。



(2) 肺癌手術後胸膜炎(77 歳男性)患者胸水より培養された同定不能 NTM 菌を mlstverse は高スコア(0.998)で *Mycobacterium mageritense* と判定した(Niitsu et al., 2021)。肺 NTM 症と診断されていた 44 歳女性の喀痰より培養された *Mycobacterium mucogenicum* 近縁菌株(TY81, RIMD1333001^T)が新種であることを証明し、*Mycobacterium toneyamachuris* と命名した³⁾。肺 NTM 症と診断されていた 82 歳女性の喀痰より培養された同定不能菌株(TY48, RIMD2001001, CIP111916^T)が新種の *Tsukamurella* であることを証明し、*Tsukamurella toyonakaense* と命名した(Kuge et al., 2022)。肺 NTM 症と診断されていた 74 歳男性の喀痰より検出された *Mycobacterium avium* 近縁菌株(TY59^T, RIMD1371001^T, CIP111917^T)が新種であることを証明し、*Mycobacterium senriense* と命名した(Abe et al., 2022)。さらに肺 MAC 症治療中 61 歳女性より検出された同定不能菌株(TY813, RIMD1378001, CIP112420^T)、以前より *Mycobacterium gordonae* による肺 NTM 症と診断されていた 82 歳女性より検出された菌株(TY814, RIMD1379001, CIP112421^T)、肺 MAC 症に対する手術 8 年後再発肺 NTM 症と診断された 70 歳男性より検出された菌株(TY815, RIMD1379002, CIP112422^T)が *M. gordonae* clade に属する新種であることを証明し、*Mycobacterium novusgordonae* (TY813)、*Mycobacterium shingordonae* (TY814 と TY815 は同一菌種)と命名した(論文投稿中)。

(3) 88 名を登録、内 68 名で排菌菌株の経時的変化を解析可能であった。68 名中、MR-MAC-PD 診断後もマクロライド内服が継続された 43 名中マクロライド感受性が回復した症例は 1 名(2.3%)であったのに対して、マクロライド内服が中止された 25 名中マクロライド感受性は 13 名(52.0%)で回復しており(p=0.009, IPW 補正 p=0.00003, 多変量解析 p=0.0002)、MR-MAC-PD 診断後のマクロライド内服継続はマクロライド感受性回復を妨げていた。一方、MR-MAC-PD 診断後のマクロライド内服継続の有益性は、生存改善を含め、認めなかった。MR-MAC-PD 診断時と直近の喀痰培養菌株の比較可能であった 30 名(内 7 名でマクロライド感受性が回復)中、VNTR スコア変化(明かな菌株変化)はわずか 3 名(内 2 名でマクロライド感受性が回復)のみであった。全ゲノムシーケンス解析 rrl 遺伝子 2058 及び 2059 位の解析では同一菌株内に複数の genotype が存在し、耐性変異の多寡が菌株全体としてのマクロライド感受性を決定している可能性が示唆された(論文投稿中)。

(4) 54 名を登録、NALC-seq 法は 53 名で抗酸菌を検出、培養検体を用いた MGIT-seq 法との一致率は全体で 83.3%、喀痰抗酸菌塗沫 1+以上の検体では 100%であった。シーケンサーに MinION を用いればリアルタイムの解析が可能となり、喀痰検体採取からわずか数時間で亜種レベルの網羅的菌種同定が可能となる(論文投稿中)。



参考文献

- 1) 日本結核・非結核性抗酸菌症学会非結核性抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会感染症・結核学術部会. 成人肺非結核性抗酸菌症化学療法に関する見解-2023 年改訂-. *Kekkaku* 2023; 98:1-11.
- 2) Matsumoto Y et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. *Emerg Microbes Infect* 2019; 8:1043-1053.
- 3) Kuge T et al. Pulmonary disease caused by a newly identified mycobacterium: *Mycobacterium toneyamachuris*: a case report. *BMC Infect Dis* 2020; 20:888.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4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, Abe Y, 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 Niitsu Takayuki, Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Abe Yuko, Okamoto Masashi, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Pleural Effusion Caused by Mycolicibacterium mageritense in an Immunocompetent Host: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	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) 10.3389/fmed.2021.797171	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 -
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 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, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Chronic Pulmonary Disease Caused by <i>Tsukamurella toyonakaense</i>	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木田博
2. 発表標題 肺NTM症の血清診断
3. 学会等名 第99回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福島清春
2. 発表標題 非結核性抗酸菌症における分子疫学サーベイランスのための次世代基盤技術の確立
3. 学会等名 第99回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木田博
2. 発表標題 肺非結核性抗酸菌症の診断基準を見直す
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松木隆典、福島清春、松本悠希、橋本和樹、新居卓朗、元岡大佑、辻野和之、三木啓資、中村昇太、木田博
2. 発表標題 リアルタイムコアゲノム解析による非結核性抗酸菌症の迅速・高精度同定法の確立および臨床応用
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久下朋輝、福島清春、安部祐子、川崎貴裕、松木隆典、白山敬之、辻野和之、三木啓資、森雅秀、北田清悟、木田博、熊ノ郷淳
2. 発表標題 同定不能抗酸菌と誤同定された新種のTsukamurella toyonakaenseによる慢性肺感染症の一例
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本悠希、福島清春、元岡大祐、金城武士、木田博、中村昇太
2. 発表標題 次世代シーケンサーMinIONを用いた抗酸菌リアルタイム同定システムの開発
3. 学会等名 第97回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新津敬之、福島清春、松本悠希、安部祐子、新居卓朗、木庭太郎、松木隆典、元岡大祐、辻野和之、三木啓資、中村昇太、木田博
2. 発表標題 リアルタイムコアゲノム解析による非結核性抗酸菌症の迅速・高精度同定法の確立および臨床応用
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安部祐子、福島清春、松本悠希、新津敬之、新居卓朗、木庭太郎、松木隆典、元岡大祐、辻野和之、三木啓資、中村昇太、木田博
2. 発表標題 リアルタイムコアゲノム解析による非結核性抗酸菌症の迅速・高精度同定法の確立および臨床応用
3. 学会等名 第41回日本サルコイシス/肉芽腫性疾患学会総会
4. 発表年 2021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	福島 清春 (Fukushima Kiyoharu) (00752156)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤) (14401)	

	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
研究協力者	中村 昇太 (Nakamura Shota)		
研究協力者	松本 悠希 (Matsumoto Yuki)		
研究協力者	元岡 大祐 (Motooka Daisuke)		

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