

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12721

研究課題名（和文）ナノポアDNAシーケンサーを応用したハイスループット結核菌遺伝子型別法の開発

研究課題名（英文）Development of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method using nanopore DNA sequencing

研究代表者

村瀬 良朗（Murase, Yoshiro）

公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部 結核菌情報科・科長

研究者番号：80535998

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）：本研究では、ナノポアシーケンシング技術を用いた結核菌のVNTR解析法を開発し、従来法と同等の高精度（99.5%）が達成できることを示した。また、ナノポアシーケンシングデータから18種類の抗結核薬に対する薬剤感受性を96.8%の精度で予測できることを明らかにした。ナノポアシーケンシング技術、結核対策に必要な結核菌の遺伝子型別と薬剤感受性予測を、一般検査室レベルで迅速・簡便・安価に実施できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発されたナノポアシーケンシング技術を用いた結核菌の解析法は、従来法と同等の精度を有しながら、より迅速・簡便・安価に実施できる可能性を示しており、結核対策の推進に大きく貢献することが期待される。本法の普及により、結核菌の遺伝子型別と薬剤感受性予測を一般検査室レベルで実施できるようになれば、感染源や感染経路の特定、最適な治療法の選択など、結核まん延防止に向けた様々な対策を迅速に講じることができるようになる。このように、本研究成果は学術的のみならず社会的にも大きな意義を有している。

研究成果の概要（英文）：We developed a VNTR genotyping method for Mycobacterium tuberculosis using nanopore sequencing technology, demonstrating high accuracy (99.5%) comparable to conventional methods. We also demonstrated that drug susceptibility to 18 anti-TB drugs could be predicted with 96.8% accuracy from nanopore sequencing data. This method may enable rapid, simple, and inexpensive genotyping and drug susceptibility prediction of M. tuberculosis, which are essential for TB control, at the level of general testing laboratories.

研究分野：分子疫学

キーワード：結核 分子疫学 VNTR ナノポア・シーケンシング 遺伝子型別 薬剤耐性 結核対策

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

結核は古くから知られる感染症であるが、現在でも世界で年間約 1,000 万人の新規患者が発生し、150 万人以上が命を落としている。日本でも 2021 年に低蔓延国入りを果たしたものの、未だ年間 1 万名の新規患者が発生しており、結核対策の重要性は変わらない。また、医療施設や学校等での結核の集団感染も後を絶たず、社会的にも大きな問題となっている。

結核は患者から排出されたエアロゾルに含まれる結核菌を吸入することで感染が広がるが、感染から発病までの期間が長いことや、見知らぬ他人からの感染も多いことから、感染経路の特定は容易ではない。そのため、結核菌の遺伝情報に基づく分子疫学的解析による感染経路の科学的解明が、結核対策において特に重要となる。

現在、日本では結核菌の分子疫学的解析に反復配列多型(VNTR)解析が広く用いられている。VNTR 解析は、結核菌ゲノム上に散在する反復配列領域の反復回数の違いを利用して菌株を識別する方法である。しかし、VNTR 解析には、PCR 増幅と DNA 断片長測定における分析精度の確保や、多検体を同時に処理することの難しさ、コスト高などの課題がある。特に分析精度の点では、800 塩基対以上の長鎖領域の解析が困難であることや、分析担当者の技量に依存することなどが課題となっている。

近年開発されたナノポアシーケンス技術は、数十万塩基にも及ぶ長鎖の DNA 分子を直接解読することが可能であり、結核菌ゲノムの高精度な解読が期待できる革新的な技術である。本研究では、ナノポアシーケンサーから得られる長鎖の DNA 配列情報を用いて *in silico* で VNTR 領域の反復回数を直接カウントすることで、結核菌の VNTR 解析の分析精度と効率化を向上させることを目指した。また、結核対策に必須の薬剤感受性予測情報の同時解析についても評価した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 3 点である。

1. ナノポアシーケンス技術を応用した結核菌 VNTR 解析法(ナノポア VNTR 法)を開発すること
2. ナノポア VNTR 法の分析精度を従来法と比較検証すること
3. ナノポアシーケンスデータから結核菌の薬剤感受性を予測する方法を確立すること

これらにより、高精度かつ効率的な結核菌の分子疫学的解析法の確立を目指す。ナノポア技術を応用することで、結核対策に必要な不可欠な結核菌の遺伝子型別と薬剤感受性予測を、一般検査室レベルで迅速・簡便・安価に実施できるようになる。本研究は、我が国のみならず世界の結核対策の推進に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 研究対象とゲノム DNA の調製

結核予防会結核研究所に保管されている結核菌株の中から、国内で分離された結核菌臨床分離株 95 株(多剤耐性結核菌 82 株含む)と結核菌 H37Rv 株(実験室標準株)の合計 96 株を研究対象とした。これらの結核菌株を小川培地または 7H10 寒天培地で培養し、得られた菌体からゲノム DNA を抽出した。DNA 抽出は、菌体をガラスビーズとともに振盪して機械的に破碎し、フェノール・クロロホルム処理により精製する方法で行った。DNA 濃度は Nanodrop (ThermoFisher)及び Qubit (ThermoFisher)を用いて測定した。

(2) ナノポアシーケンシング

精製した結核菌ゲノム DNA を用いて、Oxford Nanopore Technologies 社のシーケンサー (MinION/GridION)によるナノポアシーケンシングを行った。ライブラリー調製は Rapid barcoding kit (SQK-RBK104-96, SQK-RBK114-96, ONT)を用いて行い、得られた DNA 断片を、R9.4.1 フローセルと R10.4.1 フローセルの 2 種類のフローセルを用いてシーケンシングした。生成された Fast5 ファイルは、Guppy basecaller version 6.4.6 でベースコールして FASTQ ファイルに変換した。

(3) ナノポア VNTR 法

ナノポアシーケンサーから得られた長鎖リードを用いて、結核菌ゲノム上の VNTR 領域の反復回数を求めるために *in silico* VNTR を実施した。具体的には、MIRUReader プログラムを用いて、ナノポアリードに対して *in silico* PCR を行い、仮想的に計算される増幅産物の長さから反復回数を算出した。分析対象領域は、国内で用いられている 24 Beijing-VNTR 領域と国際的に広く用いられている 24 loci MIRU-VNTR の双方を網羅する合計 36 領域とした。得られた結果を、従来のキャピラリーシーケンサーを用いたフラグメント解析による結果と比較することで、ナノポア VNTR 法の精度を評価した。

(4)結核菌ゲノム情報に基づく薬剤感受性予測

ナノポアシーケンサーから得られたリード配列を用いて、TB-profiler プログラム version 6.2.0 により 18 薬剤に対する薬剤耐性遺伝子変異を検出し、薬剤感受性を予測した。予測精度の評価対照として、イルミナ・シーケンスを用いた TB-profiler の分析結果を用いた。対象とした 18 薬剤は、リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、モキシフロキサシン、レボフロキサシン、ベダキリン、デラマニド、プレトマニド、リネゾリド、ストレプトマイシン、アミカシン、カナマイシン、カプレオマイシン、クロファジミン、エチオナミド、パラアミノサリチル酸、サイクロセリンである。

4. 研究成果

(1)ゲノム DNA 精製法の最適化とナノポアシーケンスによる評価

結核菌のゲノム解析では、細胞壁の厚さとミコール酸含量の多さから、高純度・高分子のゲノム DNA を効率的に抽出することが難しい。特にナノポアシーケンスでは、長鎖の DNA 断片を得ることが重要である。本研究では、この課題を克服するために、クロロホルムによる脱脂質とビーズ破砕を組み合わせた新規のゲノム DNA 抽出法を開発した。

Mycobacterium bovis BCG Tokyo 株を用いた検討の結果、ビーズ破砕の時間を 5 分程度に設定することで、高分子 DNA の収量と純度のバランスが最適化されることがわかった(図 1、図 2)。本法で得られた結核菌 DNA を用いてナノポアシーケンスを行ったところ、平均リード長が 10kbp 以上かつ、ゲノムカバレッジも 99.97%を示す高品質のリードが得られた(data not shown)。これらは、本法によって得られるゲノム DNA がナノポアシーケンスに適していることを示している。

(2) ナノポア VNTR 法の精度検証

結核菌 96 株を対象に、(1)で確立した方法でゲノム DNA を抽出し、ナノポアシーケンスライブラリーを調製した。シーケンスには R9 および R10 の 2 種類のフローセルを用い、出力されたシグナルデータを Guppy basecaller で FASTQ 形式に変換した。得られた長鎖リードデータを用いて、国内外の主要な VNTR 領域 33 カ所を対象とした *in silico* VNTR を行った。

シーケンス精度の異なる R9 と R10 フローセルのデータを用いて解析精度を比較したところ、最新の R10 フローセルでは 99.5%、R9 フローセルでも 99.1%という高い正答率(従来法に対する一致率)が得られた(表)。これは、従来のイルミナリードを用いた場合(*de novo* assembly されたドラフトゲノム)の 36.2%を大きく上回る成績である($p < 0.001$, data not shown)。R10 は R9 の改良型であり、読み取り品質に優れる。そのため、*in silico* PCR 時のプライマー検索領域におけるミスマッチが減少することで高い正答率が得られた。

R10 フローセルのデータを用いたローカス別の解析では、25 領域で 100%の正答率を達成した一方、8 領域では正答率が 94.8 – 99.0%に留まった(表)。VNTR システム毎の正答率は、国内で使用される JATA システムでは JATA (12) 99.5%、JATA (15) 99.4%、JATA (18) 99.2%、国際的に使用される MIRU システムでは MIRU (15) 99.3%、MIRU (24) 99.6%、MIRU (28) 99.5%であった。以上より、ナノポアシーケンサーから得られる長鎖リードを用いることで、結核菌の VNTR 型別を高精度に行えることが実証された。フローセルの改良により、その精度は従来法と同等レベルに達しつつある。一部の領域では解析精度に課題が残されており、反復配列数を同定するアルゴリズムのさらなる改良が望まれる。

(3)ナノポア・シーケンスに基づく薬剤感受性予測の精度評価

結核菌の分子疫学解析では、VNTR 分析と並んで薬剤感受性情報が重要である。ナノポアシーケンスを用いて薬剤感受性を予測する際の精度を、イルミナシーケンスを基準として評価した。

96 株のナノポアおよびイルミナデータを対象に、TB-profiler プログラムを用いて 18 種類の抗結核薬に対する感受性予測を行った。イルミナに対するナノポア予測の一致率は 96.8%であった。不一致は全ての薬剤で生じており、特定の薬剤に限定されなかった(data not shown)。不一致の原因は薬剤耐性関連遺伝子領域におけるシーケンスエラーに起因する偽陽性が主な原因であった。ナノポアシーケンサーは塩基の読み間違いが多いため、耐性変異を過剰に検出する傾向がある。この問題の解決には、耐性変異検出アルゴリズムの高度化・最適化が重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Mitsunori, Chien Jung-Yien, Morimoto Kozo, Kinjo Takeshi, Aono Akio, Murase Yoshiro, Fujiwara Keiji, Morishige Yuta, Nagano Hiroaki, Jou Ruwen, Hasegawa Naoki, Ato Manabu, Hoshino Yoshihiko, Hsueh Po-Ren, Mitarai Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular Epidemiological Characteristics of Mycobacterium abscessus Complex Derived from Non-Cystic Fibrosis Patients in Japan and Taiwan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0057122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00571-22	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 Aono Akio, Murase Yoshiro, Chikamatsu Kinuyo, Igarashi Yuriko, Shimomura Yoshiko, Hosoya Makiko, Osugi Asami, Morishige Yuta, Takaki Akiko, Yamada Hiroyuki, Mitarai Satoshi	4. 巻 103
2. 論文標題 In vitro activity of tedizolid and linezolid against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: a comparative study using microdilution broth assay and genomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 115714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115714	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 Fujiwara Keiji, Yoshida Mitsunori, Murase Yoshiro, Aono Akio, Furuuchi Koji, Tanaka Yoshiaki, Ohta Ken, Ato Manabu, Mitarai Satoshi, Morimoto Kozo	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential Cross-Transmission of Mycobacterium abscessus among Non-Cystic Fibrosis Patients at a Tertiary Hospital in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0009722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00097-22	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 Yamura Sou, Kawada Naoki, Yamakado Shinnosuke, Kyosei Yuta, Watabe Satoshi, Yoshimura Teruki, Murase Yoshiro, Mitarai Satoshi, Ito Etsuro	4. 巻 204
2. 論文標題 Non-amplification nucleic acid detection with thio-NAD cycling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2022.106647	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 Igarashi Yuriko, Osugi Asami, Murase Yoshiro, Chikamatsu Kinuyo, Shimomura Yoshiko, Hosoya Makiko, Aono Akio, Morishige Yuta, Yamada Hiroyuki, Takaki Akiko, Mitarai Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of 14 Nontuberculous Mycobacteria Type Strains	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 01214-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01214-22	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 -

〔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 下村佳子, 細谷真紀子, 大薄麻未, 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 高木明子, 山田博之, 御手洗聡
2. 発表標題 抗酸菌DNAクロロホルムビーズ破碎抽出法におけるビーズ径の影響
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 細谷真紀子, 下村佳子, 大薄麻未, 森重雄太, 村瀬良朗, 近松絹代, 青野昭男, 五十嵐ゆり子, 山田博之, 高木明子, 御手洗聡
2. 発表標題 抗酸菌DNAクロロホルムビーズ破碎抽出法におけるビーズ量の影響
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------