

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17880

研究課題名（和文）救急現場オンサイトでの迅速感染症診断を可能にする超小型シーケンスシステムの確立

研究課題名（英文）Establishment of an ultra-compact sequencing system that enables rapid on-site diagnosis of infectious diseases at emergency sites

研究代表者

中村 文子（NAKAMURA, Fumiko）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80701721

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）：当院に救急搬送され、腹部緊急手術を行なった汎発性腹膜炎患者16例を対象とした。手術中に腹水を採取し、得られた検体を分割し、一般細菌培養の結果が陰性の検体であっても、MinIONでは細菌の同定が可能であった。MinIONによる迅速細菌同定法により高精度に細菌の判別・同定を行うことができ、感染症診断ツールとして有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、16SrRNA遺伝子を指標としたMinIONを用いた迅速細菌同定法の有用性を検証し、臨床的アウトカムの向上に繋がる技術基盤を確立することを目的とした。当院に救急搬送され、腹部緊急手術を行った汎発性腹膜炎患者を対象とした。MinIONによる迅速細菌同定法はより高精度に細菌の判別・同定を行うことができ、感染症ツールとして有用である。

研究成果の概要（英文）：The study involved 16 patients with generalized peritonitis who were rushed to our hospital and underwent emergency abdominal surgery. Ascites was collected during surgery and the resulting samples were divided. Even in samples where the results of general bacterial culture were negative, it was possible to identify bacteria using the MinION. The rapid bacterial identification method using the MinION enabled highly accurate discrimination and identification of bacteria, making it a useful tool for diagnosing infectious diseases.

研究分野：腹部救急

キーワード：MinION 16SリボソームRNA遺伝子 腹水 腹腔内感染症

1. 研究開始当初の背景

感染およびそれに伴う合併症対策は救急・集中治療分野における最重要課題の一つである。感染管理において抗菌薬の適正投与には病原菌の同定が重要な情報となるが、現在の標準的検査である細菌培養法は精度や迅速性において解決すべき問題点を抱えている。申請者らは遺伝子解析における革新的技術であるナノポアシーケンサー MinION を活用し、検体取得から3時間以内に病原菌を種レベルで同定することに成功した。本申請では救急医療の現場において直面する重篤かつ多岐にわたる感染症例の診断ツールとして MinION を用いた迅速細菌同定法の有用性を検証し、臨床的アウトカムの向上に繋がる技術基盤を確立することを目的とする。医療現場での即時細菌検査を可能にする MinION シーケンシング技術を活用し、これまで困難であった術後経過に伴う細菌プロファイルの変動と病態との関連性を明らかにすることで、より適切な感染予防・抗菌治療を実現するためのエビデンス構築を目指す。救急・集中治療領域において感染症管理は治療の要であり、早期かつ適切な抗菌治療が求められる。しかしながら現在の標準的な検査である細菌培養法では結果を得るのに数日を要するため、やむを得ず経験的に抗菌薬を選択、使用することが多いのが現状である。また培養が困難な細菌には対応できないことから、病態形成に関わる病原微生物について得られる情報も断片的とならざるを得ない。近年ではカルバペネム耐性腸内細菌や多剤耐性緑膿菌などの出現が社会問題となっており、広域スペクトラム抗菌薬の過剰な継続投与は耐性菌出現抑制の観点からも避けるべきである。そのため早期から細菌感染の拡大を防ぐことが肝要であり、抗菌薬の適正使用のため迅速かつ高精度な感染診断ツールが求められている。

従来の培養検査による感染症診断の欠点を補う新技術として、病原菌の遺伝子解析に基づく検査法が開発されている。遺伝子検査による細菌同定では、全ての細菌が有する 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子が系統分類の指標としてよく用いられる。検体中に含まれる細菌の遺伝子配列を取得・解読することによって、幅広い種類の細菌を客観的かつ高精度に同定することが可能である。さらに DNA を解析対象とすることから培養不可能な細菌同定においても効力を発揮する。このように遺伝子解析による細菌同定法は、感染症診断において従来の培養法にはない優位性を備えているものの、臨床応用を実現するためには未だ多くの制約が存在する。すなわち解析のために高額な大型の次世代シーケンサーを必要とし、配列情報の取得からその後のデータ解析に最低でも1~2日を要し迅速性に欠けるなど、いずれも医療機関への普及に必要な水準を満たすものではなかった。

最近、これらの欠点を克服する全く新しい原理に基づく超小型ナノポアシーケンサー MinION が開発され注目を集めている。MinION の特徴である長鎖 DNA シーケンシング技術がもたらす解像度の高さ、リアルタイムデータ解析(遺伝子配列の取得と配列検索・菌種同定を平行して実行する)による迅速性を活用し、検体の取得から最短で3時間以内に細菌を種レベルで同定することに成功した。

核酸シーケンス技術を用いた細菌同定法は、従来時間を要する検査であり保険収収もされていない。救急・集中治療領域での臨床応用は未だなく、当該分野への適応性および診断法としての評価も定まっていない。そこで本確立した MinION による病原細菌同定法を更に発展さ

せ、救命・救急医療において直面する様々な感染症の迅速診断法としての有用性を検証し、臨床的アウトカムの向上に繋がる技術基盤の確立を目指す。

2．研究の目的

感染およびそれに伴う合併症対策は救急・集中治療分野における最重要課題の一つである。感染管理において抗菌薬の適正投与には病原菌の同定が重要な情報となるが、現在の標準的検査である細菌培養法は精度や迅速性において解決すべき問題点を抱えている。従来培養検査による感染症診断の欠点を補い、診断の精度や迅速性の向上につながる新技術として、病原菌の遺伝子解析に基づく検査法として超小型シーケンシステム MinION が注目されている。

今回、16SrRNA 遺伝子を指標とした MinION を用いた迅速細菌同定法の有用性を検証し、臨床的アウトカムの向上に繋がる技術基盤を確立することを目的とした。

3．研究の方法

・ MinION シーケンシングによる細菌同定

(1) サンプル調製(DNA 抽出)

検体の性状(固体系、液体系、粘度)に応じ DNA 抽出法の最適化を図る。遠心操作によるヒト由来組織や夾雑物の分離のほか、細菌 DNA を効率よく抽出するためセラミックビーズによる物理的破碎と酵素消化を組み合わせた前処理を行う。得られた細菌ライセートについてスピニングラムを用いたアフィニティー精製により細菌 DNA を抽出する。

(2) PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅

既に設計済みのプライマーと反応条件に基づき、検体より抽出した DNA を鋳型として PCR により 16S rRNA 遺伝子を増幅する。使用するユニバーサルプライマーは 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長領域をカバーしており、幅広い種類の細菌の 16S rRNA 遺伝子を網羅的に増幅することが可能である。さらにプライマーには検体を識別可能な人工配列(バーコード)が付加されており、複数の検体(最大 12 サンプル)を同時シーケンシングに対応している。

(3) シーケンシング

長鎖 DNA のシーケンシングに対応した MinION を用いることにより、1 回のシーケンスランで 16S rRNA 遺伝子の全長配列(約 1500 塩基)を決定することができる。断片的な塩基配列(300 塩基程度)しか得られなかった従来のシーケンサーに比べて遺伝子配列の情報が格段に増すため、より高精度な細菌の判別・同定が可能である。

(4) データ解析・細菌種の同定

既に導入済み細菌ゲノム配列データベースと半自動化された配列検索プログラムを用いて、シーケンスデータの解析を行い菌種を同定する。本システムでは外部データベースへのアクセスなどインターネットを介したデータの送受信を必要とせず、配列解析の高速化を実現した。さらに MinION シーケンシングでは読まれた塩基配列がリアルタイムに出力されるため、シ

ークエンシングの途中でも随時データを回収し配列解析に移ることができる。以上より細菌同定に要する時間を大幅に短縮することに成功している。

当院に救急搬送され、腹部緊急手術を行った汎発性腹膜炎患者 16 例（上部消化管穿孔 4 例、下部消化管穿孔 7 例、穿孔性虫垂炎 3 例、壊疽性胆嚢炎 2 例）を対象とした。手術中に腹水を採取し、得られた検体を分割し、MinION による解析と並行して一般細菌培養検査による菌種同定を行い結果を比較する。

4 . 研究成果

今回、陰性対照を置き実験を行ったが明らかなコンタミネーションは認めなかった。

一般細菌培養の結果陰性であった 5 例について、MinION では細菌の同定が可能であった。

上部消化管穿孔のうち、一般細菌培養の結果陽性であった 2 例は MinION でも同じ結果を認めた。

下部消化管穿孔・虫垂炎・胆嚢炎のうち、一般細菌培養の結果陽性であった 9 例は MinION では一般細菌培養で同定できなかった細菌の同定も可能であった。

MinION による迅速細菌同定法はより高精度に細菌の判別・同定を行うことができ、感染症ツールとして有用であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村文子
2. 発表標題 救急現場オサワでの迅速感染症診断を可能にする超小型シークエンスシステムの確立
3. 学会等名 日本救急医学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------