

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0179

研究課題名（和文）インドネシアに流行する抗酸菌のゲノム疫学研究

研究課題名（英文）Genomic Epidemiological Study of Mycobacteria circulating in Indonesia

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） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：2020年度から2022年度はMinIONシーケンサーの出力からリアルタイム同定を行う mlstverse-webの開発を行った。2023年度にKarunawati副医学部長の協力の下、MinIONと開発したシステムをインドネシア大学へ導入した。現地にて分類不能のNTM培養検体9検体から次世代シーケンス解析を実施したところ、*M. abscessus* subsp. *abscessus* 5例、*M. colombiense* 1例、*M. farcinogenes* 1例が同定された。2例についてはいずれの菌種のスコアも低く新種の可能性があり、インドネシアにおける高精度な菌種同定の重要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2019年にSaptawatiらによって行われた同国の結核疑い患者を対象とした後ろ向き研究によると、結核疑いと診断されていた患者から取得された単離株の15%が、NTMであることが明らかとなった。NTMは亜種レベルで薬剤感受性が異なるため、本来であれば詳細な菌種同定を行ってから治療方針を決定する必要がある。そのため結核陽性と診断されたうちの15%のNTM症例については、多剤耐性結核菌として扱われるなど、適切な治療を行えていなかった可能性がある。この誤診がインドネシアにおける結核根絶を妨げる一因になっていると考えられることから、迅速かつ正確な同定法の導入が治癒率改善につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：From fiscal year 2020 to 2022, we developed the mlstverse-web system for real-time species identification using MinION sequencer. In fiscal year 2023, with the cooperation of Vice-Dean Karunawati, we installed the MinION and the developed mlstverse-web system to the University of Indonesia. The next-generation sequencing analysis was performed using nine NTM culture samples obtained in Indonesia that could not be identified by conventional tests. As a result, five cases of *M. abscessus* subsp. *abscessus*, one case of *M. colombiense*, and one case of *M. farcinogenes* were identified. For two cases, the scores for any species were low, suggesting the possibility of new species, highlighting the importance of accurate species identification in Indonesia.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：結核 非結核性抗酸菌症 MLST 分子疫学

## 1. 研究開始当初の背景

インドネシアは世界でも有数の結核高蔓延国であり、病原体である結核菌の同定はその予防および治療に極めて重要である。一方で同国において、過去に結核疑いと診断された患者のうち15%程度が、非結核性抗酸菌(NTM: Non-Tuberculous Mycobacteria)による感染であったことが最近報告された[1]。NTMは200種を超え、治療にはより正確な同定を要するため、予防法および治療法の確立が困難とされてきた。したがってインドネシアにおける結核疑いとされている患者の少なくない数が、NTM症の誤診断によると考えられ、不適切な治療計画の下、治療を続けている可能性がある。

## 2. 研究の目的

これまでに我々が開発してきた MLST (multilocus sequence typing) をベースとした同定手法[2]を用いて、インドネシアにおける抗酸菌症疑いの患者由来の検体のゲノム解析を行う。これにより、結核に紛れた潜在的な NTM 症を同定するとともにその疫学調査を行う。この手法では次世代シーケンサーによる全ゲノム解析によって得られた配列を利用して解析を行うが、インドネシアでは次世代シーケンサーの普及が進んでいないため、インドネシア大学へ技術提供を行い、次世代シーケンサー MinION の導入を支援する。またネットワークを通じて解析する計算ネットワーク基盤を確立し、国境を超えた抗酸菌のゲノム解析ネットワークを構築することで、高度な専門知識を必要とすること無く、高精度な菌種同定を行えるように環境を整える。構築したシステムを用いて、インドネシア大学の保存菌株に対して迅速同定を実施し、200 検体を目標として疫学調査を実施する。これにより、従来、結核疑いとされてきた NTM 症患者へ適切な治療を提供することが可能になると期待される。

## 3. 研究の方法

本海外連携研究では下記の項目について研究を実施し、環境を問わず抗酸菌を正確に同定しうる基盤を構築するとともに、インドネシアで蔓延する結核および NTM 症の実態について疫学調査を実施する。

### (1) MLST をベースとした同定手法をもとにした、リアルタイム同定システムの構築

これまでに申請者らが開発してきた MLST をベースとした解析手法を用いることで、ゲノムサイズの 10 倍程度という少量のデータがあれば、NTM の菌種同定を亜種レベルで行うことができることが、これまでの検討により判明している。そこでシーケンス中にリアルタイムに配列が得られる次世代シーケンサーである MinION を用いてこの手法を拡張することで、シーケンスを行いながら解読されたゲノム配列を用いて菌種同定を行うリアルタイム解析システムを開発する。開発した解析システムをクラウド上に構築し、計算ネットワーク基盤の構築を行う。これにより、MinION シーケンサーに接続された計算機を介してリアルタイムにクラウド上の計算ネットワーク上で解析が行われ、病院検査室の検査担当者は情報科学の専門知識なしに高精度な菌種同定結果を得ることが可能となる。

### (2) インドネシア大学およびその連携病院における大規模な疫学調査の実施

疫学調査の実施に当たり、まずインドネシア大学への次世代シーケンサー MinION の導入支援を実施する。その後、現地で海外共同研究者である Karuniawati 副医学部長の協力のもとでゲノム解析拠点を立ち上げ、インドネシア大学病院において取得された検体の解析を実施していく。拠点の立ち上げ後は一時帰国し、日本にて方法論の開発を推進しながら継続的に渡航し、イ

インドネシア大学側との方法論および知見の共有を随時行っていく。

インドネシア大学が保有する結核疑いの患者より単離された保存菌株および、今後結核疑いと診断された患者との同意の下で検体を取得していく。過去に結核疑いと診断された患者については再度検体を取得し、別種のNTMへの感染有無を調査する。収集された検体はMinIONにより、ゲノム解読し、クラウド上に構築したリアルタイム同定システムを用いて得られた配列データから菌種同定を実施する。同定結果を診療情報と紐づけ、疫学調査を実施する。これによりこれまで不透明であったインドネシアにおける結核および抗酸菌症の、原因菌種を含めた正確な疫学情報が明らかとなる。菌種同定の結果に基づいて、結核および200種が近く知られるNTMのそれぞれとの間に交差免疫があるかどうかについて統計学的手法を用いて検証を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) リアルタイム同定システム m1stverse-web の開発

MinION の出力データをリアルタイムに処理を行い同定を行う m1stverse-web システムの開発を行った(図1)。また、m1stverse データベースの拡張により、同定可能な菌種がこれまでの175種から212種となり、加えて種名が定まっていない162種の *Mycobacterium* sp. を含むデータベースを構築した。

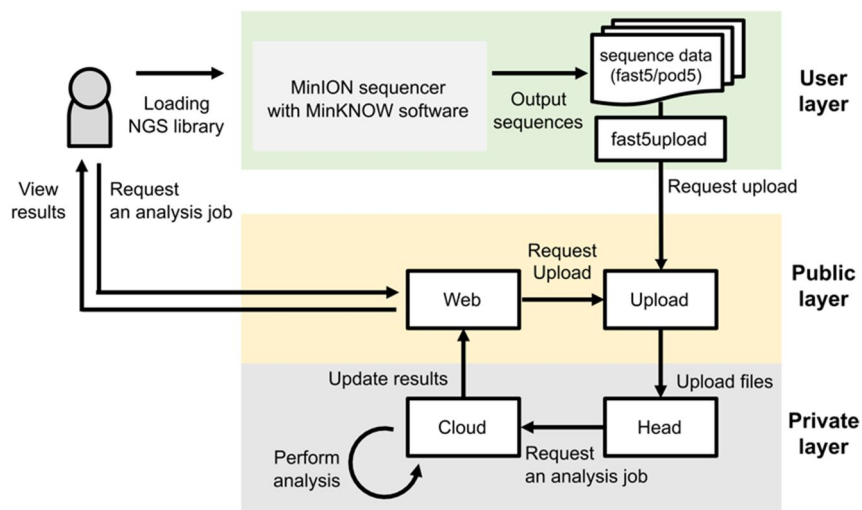


図1. 構築したリアルタイム同定システム m1stverse-web の概要図

##### (2) インドネシア大学およびその連携病院における大規模な疫学調査の実施

2023年12月17日から22日にかけてインドネシア大学にて、海外共同研究者である Karunawati 副医学部長の協力のもと、MinIONと解析したリアルタイム同定システムをインドネシア大学およびその連携病院へ導入した。現地にてNTM症患者より得られたものの分類不能とされていた培養検体9検体からライブラリを作製し、シーケンスを実施した。解析はリアルタイムで実施され(図2)、その結果、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* 5症例、*Mycobacterium colombiense* 1症例、*Mycobacterium farcinogenes* 1症例が同定された。2症例についてはいずれの菌種のスコアも低かったことから、それぞれ未報告の新種である可能性があり、インドネシアにおける高精度な菌種同定の重要性が明らかとなった。今後、インドネシアにおける結核およびNTM症の疫学調査の実施を進める。

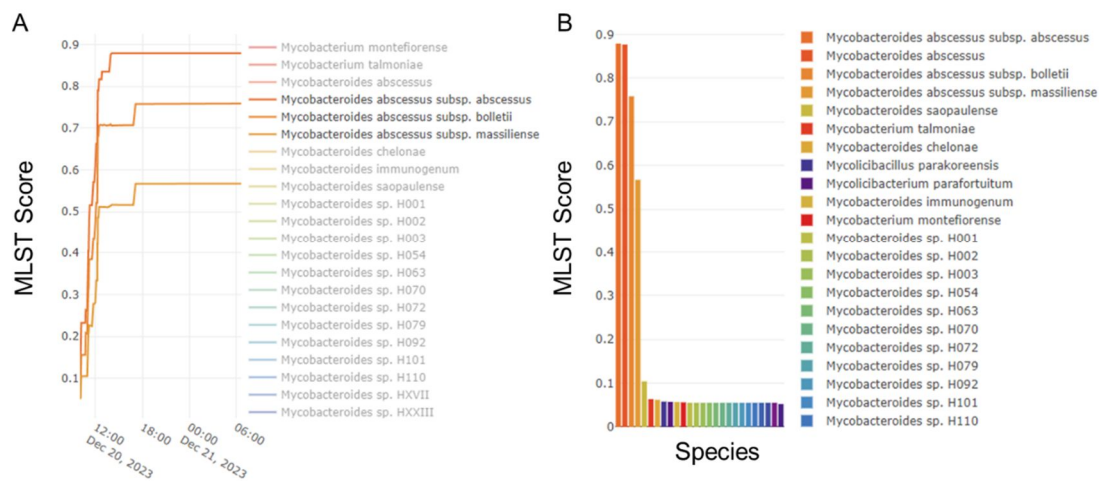


図2. インドネシア大学にて実施した菌種同定結果の例。*M. abscessus* subsp. *abscessus* と同定された1症例を解析した際の、リアルタイム解析によるスコアの経時変化(A)と最終スコア(B)を示す。

### 参考文献

- [1] Saptawati L, Kusumo H, Suryawati B. Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria (NTM) in Surakarta, Indonesia: Higher Than Expected. KnE Life Sciences. 2019; 132-138.
- [2] Matsumoto Y, Kinjo T, Motooka D, Nabeya D, Jung N, Uechi K, et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. Emerg Microbes Infect. 2019;8: 1043-1053.

## 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 Fukushima Kiyoharu, Miki Mari, Matsumoto Yuki, Uda Emi, Yamamoto Yuji, Kogita Yuya, Kagawa Yuko, Matsuki Takanori, Kagawa Hiroyuki, Oshitani Yohei, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Yoshimura Kenji, Miki Keisuke, Hayashi Akio, Nakamura Shota, Kitada Seigo, Takeuchi Yukiyasu, Kida Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The impact of adjuvant surgical treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease on prognosis and outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Research	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） 10.1186/s12931-020-01420-1	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 Abe Yoko, Fukushima Kiyoharu, Hosono Yuki, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Ose Naoko, Nakamura Shota, Kitada Seigo, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Host Immune Response and Novel Diagnostic Approach to NTM Infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4351 ~ 4351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124351	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, Abe Yoko, Akiba Eri, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Kawasaki Takahiro, Matsuki Takanori, Kagawa Hiroyuki, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Mari, Miki Keisuke, Kitada Seigo, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Kida Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Pulmonary disease caused by a newly identified mycobacterium: Mycolicibacterium toneyamachuris: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	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） 10.1186/s12879-020-05626-y	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2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

1. 発表者名 松本悠希
2. 発表標題 喀痰ダイレクトシーケンシングによる抗酸菌の網羅的同定
3. 学会等名 第6回抗酸菌研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsumoto Y, Nakamura S.	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 8
3. 書名 Methods in Molecular Biology	

〔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	松本 悠希  (Matsumoto Yuki)  (30749114)	大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	金城 武士  (Kinjo Takeshi)  (90724211)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教     (18001)	

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