

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：84427

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16319

研究課題名（和文）ナノポア技術と機械学習を用いた、抗酸菌感染症における迅速検査法に関する研究

研究課題名（英文）Research on novel micropore technology combined with artificial intelligence for mycobacterial infections

研究代表者

奥野 英雄 (Okuno, Hideo)

地方独立行政法人大阪市民病院機構大阪立総合医療センター（臨床研究センター）・臨床研究センター・医長

研究者番号：60768878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ナノポア技術は、直径3 μ mの貫通孔を微生物が通過する際の電流-時間波形を計測し、AI識別を組み合わせることで、病原体を同定する新規の病原体検出技術である。それらの技術を抗酸菌の識別に適用し、迅速な抗酸菌診断が可能となる検査系の開発を目的とした。まず、貫通孔を通過する様子を直接顕微鏡下に観察する実験系を確立し、菌体が実際に貫通孔を通過する様子を視覚的にとらえることに成功した。培養条件を変え、通常の培養時間（約1週間～）よりも短時間でナノポア計測には十分な菌量が得られ、cluster形成を改善できた。安定的にcluster形成を阻害できるような培養条件の設定が課題になる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直径3 μ mの貫通孔を微生物が通過する際の電流-時間波形を計測し、病原体を同定する新規の病原体検出技術である。ナノポア技術を抗酸菌の識別に応用し、迅速な抗酸菌診断が可能となる検査系の開発を目的とした。貫通孔を通過する様子を直接顕微鏡下に観察する実験系を確立し、菌体が実際に貫通孔を通過する様子を視覚的にとらえることに成功し、培養条件を変え、通常の培養時間（約1週間～）よりも短時間でナノポア計測には十分な菌量が得られ、cluster形成を改善できた。今後の検討で、より迅速な抗酸菌の同定が可能となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Nanopore technology is a novel pathogen detection technique that identifies pathogens by measuring the current-time waveform of a microorganism as it passes through a 3- μ m-diameter through-hole, combined with AI identification. We adapted these technologies to the identification of acid-fast bacilli to develop a test system that enables rapid diagnosis of acid-fast bacilli. First, we established an experimental system to directly observe the passage of bacteria through a through-hole under a microscope, and succeeded in visually capturing the actual passage of bacteria through the through-hole. By changing the culture conditions, we were able to obtain a sufficient amount of bacteria for nanopore measurement and improve cluster formation in a shorter period of time than the usual culture time (approximately 1 week-). The challenge is to set culture conditions that can stably inhibit cluster formation.

研究分野：感染症

キーワード：非結核性抗酸菌 迅速診断検査 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

日本国内では結核の新規発症者数、罹患率ともに年々減少傾向ではある。しかし、大阪での罹患率は依然として高く、日本全体では人口 10 万人当たり 12.3 人 (2018 年) であるが、大阪府で人口 10 万人当たり 20.3 人、特に大阪市では 29.3 人と、結核中蔓延国の基準 (10 万人当たり 20.0 人以上) を満たしている。また、肺の非結核性抗酸菌 (Nontuberculous mycobacteria, NTM) 感染症 (以下、肺 NTM 症) に関しても、漸増傾向にあるとされ、2015 年の調査では日本全体での罹患率は 10 万人当たり 14.7 人と、結核を上回るとの報告がある。

抗酸菌感染症の場合、結核はヒトからヒトへ空気感染することが知られており入院隔離を必要とする場合があるが、肺 NTM 症ではヒト-ヒト感染はせず、また治療に関しても結核は基本的に 6 か月であるが肺 NTM の場合は 1 年を超える場合が多く、使用する抗菌薬も結核と異なる場合が多いなど、結核と肺 NTM 症の間で違いがある。そのため、抗酸菌感染症と考えられた場合、患者の治療方針決定や、感染症対策、公衆衛生学的な対応のために、結核菌か NTM かの鑑別、また、薬剤耐性の有無を迅速に把握することが非常に重要である。

しかし、抗酸菌の培養には 2 週間程度の時間がかかることが多い上、薬剤耐性を把握するのはさらに時間を要する。加えて、大阪は 2025 年の万国博覧会開催などのマスメガザリングを控えており、他の結核蔓延国からの観光客流入が予想されている。世界的にみると、インド、インドネシア、中国、フィリピンで新規結核発症者は多く、その 4 か国で世界の新規結核発症者の約半数を占める。多くの国で多剤耐性結核菌も広がっており、新規結核発症者のうち、インドでは 2.8%、中国 7.1%、ロシアでは 35% もが多剤耐性結核であると報告されている。日本国内では多剤耐性結核は分離された結核菌の 0.6% とまだまだ少ないが、薬剤耐性結核菌が持ち込まれた場合、その薬剤耐性状況が迅速に診断できれば、実臨床にも公衆衛生学的にも非常に有益であると考えられる。

大阪府は、全国的にみても結核有病率が都道府県別でトップであり、感染症診療を行う上で常に鑑別として考慮しなくてはならない疾患である。日常診療で抗酸菌感染症を疑った場合、結核菌と NTM との鑑別、及びその薬剤感受性は必須の情報であり、その結果の迅速性は治療の成否に直結する。

2. 研究の目的

本研究では、ナノポア技術及び AI 識別を、抗酸菌の識別に適応し、臨床検体を用いて 10 分以内に抗酸菌の種類および薬剤耐性の診断が可能となる検査系の開発を行うことを目的とした。

ナノポア技術は、直径 3 μm の貫通孔を微生物が通過する際の電流-時間波形を計測し、AI 識別を組み合わせることで、病原体を同定する新規の病原体検出技術である。それらの技術を抗酸菌の識別に適応し、臨床検体を用いて迅速に抗酸菌の種類および薬剤耐性の診断が可能となる検査系の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で使用するナノポア技術は、直径 3 μm の貫通孔を微生物が通過する際の電流-時間波形を計測する、全く新しい微生物検出系であり、波形パターンの機械学習により、高精度な細菌検出を行う (図 1)。ナノポア技術と AI の融合システムは、大阪大学産業科学研究所教授である谷口正輝が ImPACT プログラムで日本において開発した世界で唯一の技術である。この方法は、インフルエンザウイルス検査において成果を上げ、大阪大学医学部感染制御部では、谷口正輝研究グループ (谷口研究グループ) との共同研究を行っている。その研究の中では、同種のコロナウイルスである新型コロナウイルス、SARS ウイルス、MERS ウイルスの鑑別や、新型コロナウイルス感染症の迅速診断系開発への適用も既に実証されている。ナノポア計測装置、AI 学習ソフトからなるナノポアプラットフォームは、谷口正輝が起業したベンチャー企業から商用化されており、これを用いて結核菌や NTM の検出系の確立を行う (図 2)。

使用する抗酸菌株は、医療機関での日常診療のもと、分離された菌株を使用する。それらの菌株は、Mycobacterium abscessus (M. abscessus)、M. intracellulare、M. kansasii のほかに、BCG 株などを対象とする。

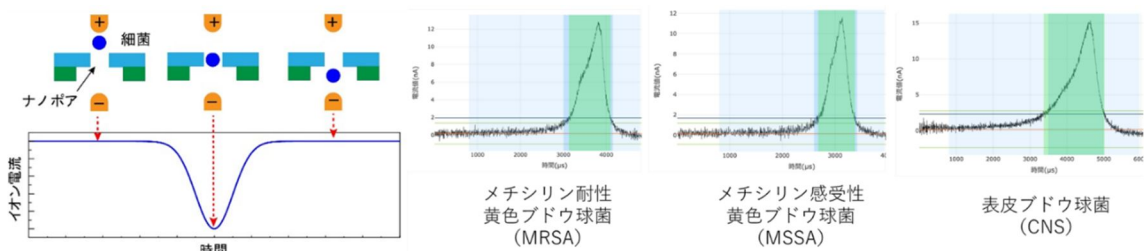


図 1. ナノポア技術の原理。負に帯電した細菌は、正電極の方に電気泳動で移動する。イオン電

流-時間波形は、細菌の体積・構造・表面電荷の情報を持つ。右図は、MRSA、MSSA、CNS の電流-時間波形。

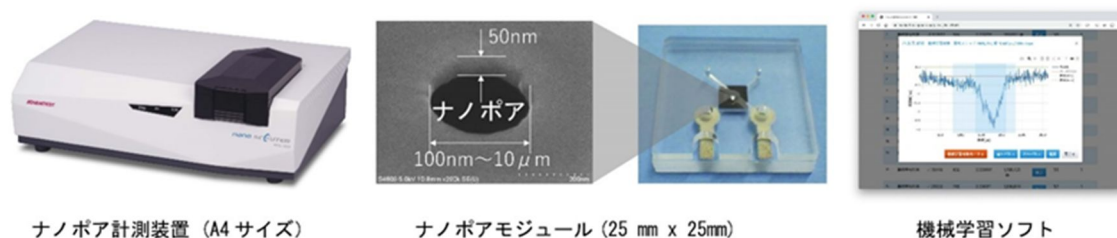


図2. ナノポアプラットフォームを構成する、ナノポア計測装置、ナノポアモジュール、機械学習ソフト。全てアイポア株式会社から商用化されている。

4. 研究成果

対象とする菌株は、臨床で分離された *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) と *M. intracellulare* 20 株ずつに加え、BCG 株や、*M. kansasii* 8 株を用いて研究を進めた。まず、Middlebrook7H9 培地 (マイコプロス、極東製薬) を用いた、通常の培養検体では、抗酸菌特有の cluster 形成 (cord 形成) が顕著であり、直径 $3\mu\text{m}$ の貫通孔は通過せず、cluster 形成をいかに阻害するかが重要であると考えられた。特に、菌種により cord 形成の速度は異なり、特に *M. abscessus* は数日で強固な cord 形成が認められた。

NTM では cluster 形成をしやすく、貫通孔を通過しても得られる波形が安定せず、複数の菌体が同時に貫通孔を通過している可能性が考えられた。そのため、貫通孔を通過する様子を直接顕微鏡下に観察する実験系を確立し、菌体が実際に貫通孔を通過する様子を視覚的にとらえることに成功した。直視的に観察しつつ、培養時間を様々な条件を変え、培養液中の菌量の目安として、吸光度を測定したところ、通常の培養時間 (約 1 週間 ~) よりもかなり短期間の培養時間でナノポア計測には十分な菌量が得られ、むしろ培養時間を長く置くよりも cluster 形成を阻害できることが分かった。これは、ナノポア技術を用いた検査により、従来の検査時間よりもかなり短縮できる可能性を示唆していると考えられた。

選択培地を、MGIT 法を用いた培地に変更し、cord 形成した抗酸菌 cluster を、超音波破碎装置などを用いて分解できるか検討したが、貫通孔を安定的に通過できるサイズに破碎することは困難であった。そのため、培地に界面活性剤を入れ、cluster 形成そのものを阻害する検討を行った。tween20 を用いた検討では、0.1% の濃度を基準として、濃度を前後し、吸光度測定による濁度で定量を行った。tween20 の濃度をあげると、cluster 形成はある程度抑えられるものの、培養によって得られる菌量が大きく減少し、安定的な培養が困難になった。より薄い濃度で測定したところ、ある程度の菌量は得られるものの、cluster 形成を安定的に阻害することは困難であった。続いて、塩化セチルピリジニウム (CPC) を検討したが、先行研究をもとに、0.5% の濃度を基準として培養条件を検討したものの、cluster 形成と菌量との安定的な条件の設定は困難であった。その理由の一つとして、NTM の菌種ごとの特性の違いも大きいことが挙げられた。*Mycobacterium abscessus* はその他の NTM と比較しても cord 形成を容易にするため cluster 形成阻害が最も困難であった。また、*Mycobacterium avium* や *Mycobacterium intracellulare* の中でも、cord 形成の程度に違いがあり、また、同じ菌種の中でも菌株による違いが認められた。今後、NTM 研究を進めていく中で、このような菌種間の特性の違いの大きさに着目する必要があることが強く示唆された。

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 宋 知栄、堤英世、汐田航平、堀田貴大、奥野英雄、柳生恭子、天羽清子
2. 発表標題 治療後肺高血圧症の改善がみられた、小児肺カンサシ症の1例
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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