

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23659505

研究課題名（和文） セルソーティングを実装したメタゲノミック診断法の開発

研究課題名（英文） Integration of cell sorting with metagenomic diagnosis system

研究代表者 安永照雄（YASUNAGA TERUO）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20260630

研究成果の概要（和文）：

我々はメタゲノム解析を応用した感染症診断法の開発に取り組み、これまでにヒト検体の抽出核酸からインフルエンザやノロウイルス、また病原性細菌の直接同定に成功してきた。これらの取り組みの中で、臨床検体中のヒトゲノムやカビや細菌など様々な生物のコンタミネーション由来の無駄な遺伝情報が検出の効率や感度を下げていることが明らかとなった。本研究では、さらなる検出の効率化と精度を高めることを目的とし、このメタゲノミック診断法にセルソーティング技術を組み入れたプロトコル開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a metagenomic diagnosis system to diagnose infectious diseases by applying metagenomic analysis. This system has enabled us to directly detect pathogenic bacteria, influenza viruses and noroviruses from clinical samples. From those analyses, it has been found that contaminants such as host genome, bacteria, and/or fungi in clinical samples reduce the efficiency and sensitivity of metagenomic detection. In order to improve the detection efficiency of the system, we developed a basic protocol of the metagenomic diagnosis system using cell-sorting technology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：メタゲノム、感染症診断、セルソーティング、バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

これまでの微生物ゲノムの解析は、単一菌種の分離、培養過程を経てゲノム DNA を調製するものであった。2005 年からの次世代シーケンサの登場により微生物群集の核酸を、分離培養を経ることなく調製し、ヘテロな DNA のシーケンシングによりゲノム解析する、いわゆる「メタゲノム解析」が可能となった。

我々は、メタゲノム解析の感染症診断への

応用に取り組んできた。すなわち、感染症の患者検体から全核酸を抽出し、その DNA 塩基配列をシーケンシングすることで、常在菌、宿主生物等の雑多な生物種の塩基配列情報の中から病原体由来の配列を特定することを目指すものである。これまでに我々は、糞便、血液、咽頭スワブ等のさまざまな臨床検体からカンピロバクター、ノロウイルス、A 型インフルエンザウイルス、肝炎ウイルスといった原因微生物の同定に成功してきた。臨

床検体には多量のヒトゲノムやカビ等が混入しており、これらの無駄な遺伝情報が、目的とする病原体の検出効率や感度を著しく低下させていることが明らかとなった。メタゲノミック診断の検出効率を改善するためには、臨床検体中に混入するヒトゲノムやその他の夾雑物を効果的に除去する技術が求められている。

2. 研究の目的

本研究ではメタゲノミック診断法にセルソーティング技術を組み入れ、効率的に細菌叢を可視化するプロトコルを開発する。ソーティング機能により、夾雑物が存在する臨床検体から病原体を効率よく分離し、回収した核酸をメタゲノム解析し病原体を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

従来の流路固定型セルソーターで感染性の検体をセルソーティングすることは安全性に非常に問題がある。そこで我々はオンチップ・バイオテクノロジー株式会社の使い捨てマイクロ流路チップ搭載のフローサイトメーター「Fishman-R」を用いた。この装置の使い捨ての流路は閉鎖系であり、汚染部が廃棄可能であることから、感染性のある病原体をソーティングする際、安全性が高い。また、検体間のコンタミネーションが問題となる臨床診断では患者毎に流路を廃棄できる本機種は我々の目指すメタゲノミック診断法にとって有力である。

本研究ではこの装置を用いて、細菌の生死判定により、便検体の前処理法や検体保存液の選択、保存法などの検討を行った。またソーティング後からメタゲノム解析までのプロトコル開発を行った。

4. 研究成果

(1) 便検体の前処理法の検討

PBS または臨床検体の保存に用いられる核酸安定化剤 RNAlater に排泄直後の糞便検体を懸濁し、10 μ m フィルターで濾過を行い、糞便中の食物残渣等を除去した。希釈糞便を SYTO9 および Propidium iodide (PI) の両色素で染色した。SYTO9 は生菌、死菌とも染色するが、PI は細胞膜の完全性を消失した細胞すなわち死菌のみを染色する。染色後、フローサイトメーター「Fishman-R」により生死判定を行った。その結果、PBS に希釈した糞便中の細菌は 95%近い生菌率を示したのに対し RNAlater に希釈した場合は、50%近い細菌が死菌としてカウントされた。このことから細菌の生死判定には RNAlater は使用できない

ことが明らかとなった。

(2) フローサイトメーターによる腸内細菌の生死判別

健康者の糞便を排便直後に採取し、PBS に希釈した。希釈した糞便は採便日以内に解析に供した。その結果、死菌は、全細菌中 10%程度であることが明らかとなった。また、同一個人内での生死割合の変動をいくつかのタイムポイントで解析した。これによると個人内の変動は小さいと考えられる。

(3) 糞便の保存方法と生死判定

次に-30℃で保管されたウシ糞便試料についても検討した。この糞便懸濁液に含まれる細菌の生死率を測定した結果、ほとんどの細菌が死菌に分画された。このことから、糞便の採取から凍結までの時間や保存法が検体中の細菌の生死率に強い影響を与えていることが示唆された。この事実を受けて我々は、以降の実験に排便直後の新鮮な糞便を用いることとし、さらに細菌叢の生死判定に適した糞便の保存法について検討を行った。被験者から採便した糞便の保存条件を変えそれぞれの細菌の生死率を測定した。一般に用いられる-80℃の凍結保存では死菌率にわずかな上昇が認められた。50%グリセロールでの-80℃凍結では死菌率の上昇が抑えられていた。4℃で保存したものでは、-80℃の時よりも死菌率が上昇していた。このことから細菌の生死判定を行う場合は、希釈糞便をろ過し、-80℃で保存することが適していると明らかとなった。

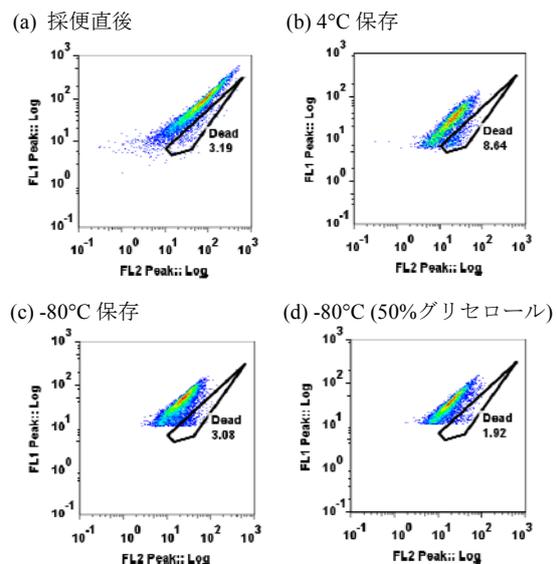


図. 糞便の保存法による生死率の変化 図中の数値は死菌率(%)を示す。

(4) 死菌の染色法の検討

先に述べたように PI は膜の完全性を消失した細菌を染色する蛍光色素である。PI の他に細胞膜の能動輸送の停止を指標とした蛍光色素として Ethidium bromide (EtBr)がある。EtBr と SYTO9 によって健康人糞便細菌叢を染め分け、フローサイトメーターで解析したところ、50%近くが能動輸送の機能を失っていた。一口に生死判別といっても、使用する死菌染色剤の種類によって死亡率は大きく変動することが判明した。また糞便中の細菌を SYTO9 と EtBr で染色すると大きく2つの細胞集団に分別可能であることが明らかとなった。

(5) 細菌のソーティング

SYTO9 と PI により生死細菌を染め分けた後、ソーティング機能を実装した Fishman-R を用いて生菌、死菌それぞれの分取を試みた。約 1000 カウントの細菌を分取し、分取した生菌、死菌分画からそれぞれ DNA をフェノール処理および QIAamp カラムテクノロジーを利用して抽出した。

セルソーティングから得られた細菌集団の 16SrRNA 遺伝子の PCR を行った。細菌ゲノム DNA を (5) と同様の方法で抽出し、16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。その結果、ソーティング分画から細菌特異的な各 16S rRNA 遺伝子 PCR 産物を得ることができた。

以上により、ソーティング技術とメタゲノム解析を組み合わせた検出法の基礎的なプロトコルを確立した。また臨床検体の鮮度を維持した保存法についての検討も今後続ける予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Tamaki H, Nakamura S, Yasunaga T, et al. (2012) Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environ Microbiol.* 14: 441-452, 査読有
DOI:10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x
2. Monira S, Nakamura S, et al. (2012) Gut microbiota of healthy and malnourished children in bangladesh. *Front Microbiol.* 2: 228, 査読有
DOI:10.3389/fmicb.2011.00228
3. Yasugi M, Nakamura S, Yasunaga T, et al. (2012) Frequency of D222G and Q223R Hemagglutinin Mutants of Pandemic

(H1N1) 2009 Influenza Virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS One.* 7: e30946, 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0030946

4. Kerdsin A, Nakamura S, Oishi K, et al. (2011) Genotypic profile of Streptococcus suis serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 17: 835-842. 査読有
DOI:10.3201/eid1705.100754
5. Nakamura S, et al. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. (2011) *Exp Biol Med* 236: 968-971, 査読有
DOI:10.1258/ebm.2011.010278

[学会発表] (計 6 件)

1. Tougan T, Nakamura S, et al. Squirrel monkey has single IgG but not subclasses. 第 3 4 回 日本分子生物学会年会、2011.12.15
2. Nakamura S, Databases for metagenomics of unexplored fields. 第 3 4 回 日本分子生物学会年会、2011.12.14
3. 中村昇太、感染症におけるメタゲノミック診断法の研究開発、生命情報科学若手の会 第 3 回研究会、2011.10.15
4. Nakamura S, Metagenomic Analysis of Bacterial Infections. 日本臨床微生物学会 IUMS、2011.9.6
5. 中村昇太、メタゲノミクスを応用した病原体検出システムの開発、生命情報科学若手の会 沖縄セミナー、2011.9.3
6. 中村昇太、感染症のメタゲノミック診断、NGS 現場の会 第一回研究会、2011.5.28

[図書] (計 3 件)

1. Nakaya T, Nakamura S, et al. Wiley-Blackwell (2011) Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, 10 pages
2. 中村昇太、羊土社 (2011) 実験医学増刊 Vol.29 No.15, 6 ページ
3. 中村昇太、中屋隆明、飯田哲也、医薬ジャーナル社 (2011) 化学療法の領域 Vol.27 No.9、7 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://imet.gen-info.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 照雄 (YASUNAGA TERUO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：20260630

(2) 研究分担者

大石 和徳 (OISHI KAZUNORI)
大阪大学・微生物病研究所・特任教授
研究者番号：80160414

中村 昇太 (NAKAMURA SHOTA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90432434

(3) 連携研究者

()

研究者番号：