

非結核性抗酸菌の迅速その場同定

中村 昇太

大阪大学 微生物病研究所

背景と目的

非結核性抗酸菌 (NTM) 症は、予防法や治療法が確立されていない。この原因の1つに、NTMの種類が200種類以上と多様で、薬剤感受性が種や亜種によって大きく異なる点があげられる。適切な治療のためには正確な種や亜種の同定が不可欠であるが、現在、抗酸菌同定に主に用いられている質量分析やDNAハイブリダイゼーション法では、種レベルの同定精度しか実現できない。そこで我々は、高精度なNTM同定の達成を目的に、184遺伝子を用いたMLST (Multi-Locus Sequence Typing) 手法の開発を行った¹⁾。

対象と方法

本MLST手法では、培養コロニーより抽出し次世代シーケンスで得られたゲノムDNAの配列情報を、データベースの配列タイプと照合し、最もマッチする配列タイプのプロファイルが同定結果となる(図1)。まずデータベースを拡張するため、理化学研究所バイオリソース研究センターから提供されたゲノム情報が不十分な抗酸菌63種について、イルミナ社とナノポア社のシーケンサーを組み合わせたハイブリッドゲノムアセンブリによりゲノム配列を解読した。そして従来の質量分析で同定/未同定の抗酸菌株について、本手法を用いた菌種同定を行った。

結果

今回新たにゲノム配列を解読し追加した結果、最終的にNTM175種、抗酸菌186種を網羅するデータベースが構築できた。このデータベースを用いた本手法により、従来の質量分析で同定された13株および従来法では同定できなかった16株すべての種同定が可能となった。またNTM175種に対して、従来の16S rRNA遺伝子(1遺伝子)を用いた解析および本手法にて同定した(図2)。その結果、従来の手法では高い配列類似性を示すクラスターにおいて正確な同定が不可能であったが(左)、本手法ではNTM175種がそれぞれ1対1の関係で高いスコアを共有し、標的菌種以外のスコアが低く抑えられた(右)。同様に *M. abscessus* の亜種レベルの識別においても、同じ亜種同士で高いスコアを共有し、他の亜種とは低いスコアで抑えられた(図3)。

さらに本手法を用いて、臨床現場でNTMを迅速同定するクラウドシス

テムの開発を行った。検査室等で行われるナノポアシーケンスの配列データを自動的に大型計算機に送り、その解析結果をリアルタイムでブラウザ上に表示するシステムで、現在国内4拠点にて実地テスト中である(図4)。

結論

本研究ではデータベースの拡張とMLSTの組み合わせにより、多様な175種のNTMが亜種レベルで同定可能になった。

1) Matsumoto Y, et al. Emerg Microbes Infect. 2019; 8(1): 1043-1053.

図1 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)を用いた解析ステップ

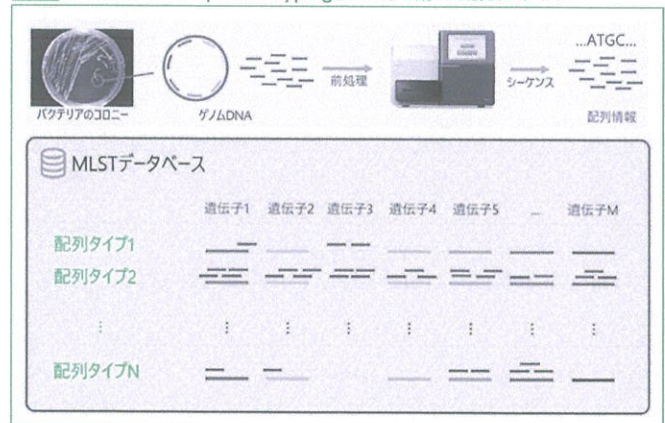
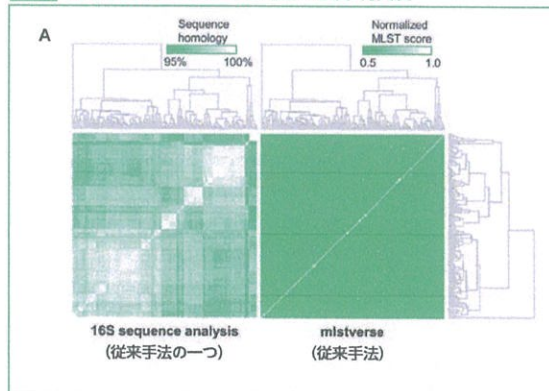


図2 同定手法別 NTM175種同定の感度・特異度*



*MLST解析において、標的病原体に対する高スコアは感度の高さを、標的以外の病原体に対する低スコアは特異度の高さを表す

図3 *M. abscessus* 亜種同定の感度・特異度*

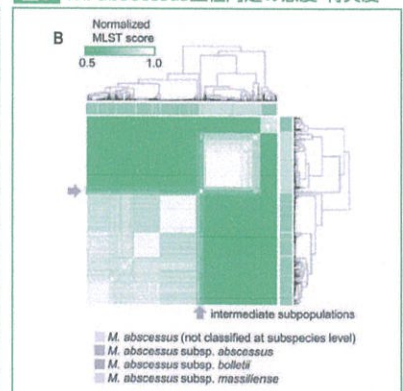
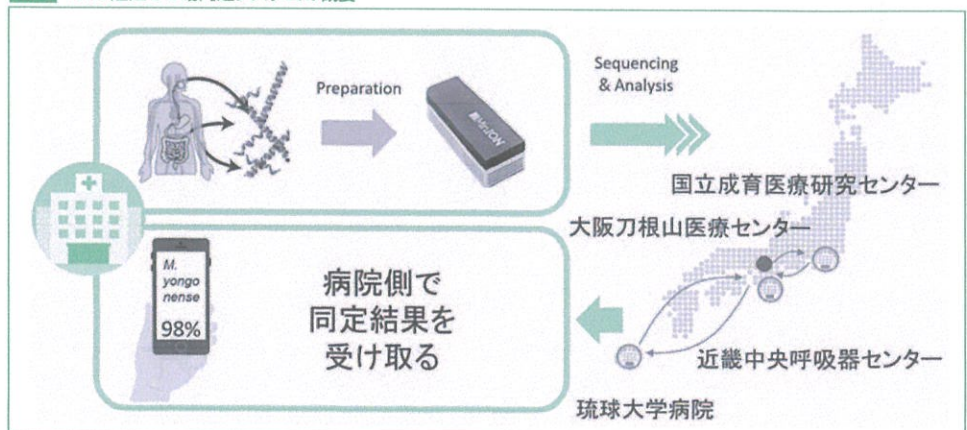


図4 NTM迅速その場同定システムの概要



2 非結核性抗酸菌の迅速その場同定

中村 昇太

大阪大学 微生物病研究所

背景と目的

非結核性抗酸菌 (NTM) 症は、予防法や治療法が確立されていない。この原因の1つに、NTMの種類が200種類以上と多様で、薬剤感受性が種や亜種によって大きく異なる点があげられる。適切な治療のためには正確な種や亜種の同定が不可欠であるが、現在、抗酸菌同定に主に用いられている質量分析やDNAハイブリダイゼーション法では、種レベルの同定精度しか実現できない。そこで我々は、高精度なNTM同定の達成を目的に、184遺伝子を用いたMLST (Multi-Locus Sequence Typing) 手法の開発を行った¹⁾。

対象と方法

本MLST手法では、培養コロニーより抽出し次世代シーケンスで得られたゲノムDNAの配列情報を、データベースの配列タイプと照合し、最もマッチする配列タイプのプロファイルが同定結果となる(図1)。まずデータベースを拡張するため、理化学研究所バイオリソース研究センターから提供されたゲノム情報が不十分の抗酸菌63種について、イルミナ社とナノポア社のシーケンサーを組み合わせたハイブリッドゲノムアセンブリによりゲノム配列を解読した。そして従来の質量分析で同定/未同定の抗酸菌株について、本手法を用いた菌種同定を行った。

結果

今回新たにゲノム配列を解読し追加した結果、最終的にNTM175種、抗酸菌186種を網羅するデータベースが構築できた。このデータベースを用いた本手法により、従来の質量分析で同定された13株および従来法では同定できなかった16株すべての種同定が可能となった。またNTM175種に対して、従来の16S rRNA遺伝子(1遺伝子)を用いた解析および本手法にて同定した(図2)。その結果、従来の手法では高い配列類似性を示すクラスターにおいて正確な同定が不可能であったが(左)、本手法ではNTM175種がそれぞれ1対1の関係で高いスコアを共有し、標的菌種以外のスコアが低く抑えられた(右)。同様に *M. abscessus* の亜種レベルの識別においても、同じ亜種同士で高いスコアを共有し、他の亜種とは低いスコアで抑えられた(図3)。

さらに本手法を用いて、臨床現場でNTMを迅速同定するクラウドシス

テムの開発を行った。検査室等で行われるナノポアシーケンスの配列データを自動的に大型計算機に送り、その解析結果をリアルタイムでブラウザ上に表示するシステムで、現在国内4拠点にて実地テスト中である(図4)。

結論

本研究ではデータベースの拡張とMLSTの組み合わせにより、多様な175種のNTMが亜種レベルで同定可能になった。

1) Matsumoto Y, et al. Emerg Microbes Infect. 2019; 8(1): 1043-1053.

図1 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)を用いた解析ステップ

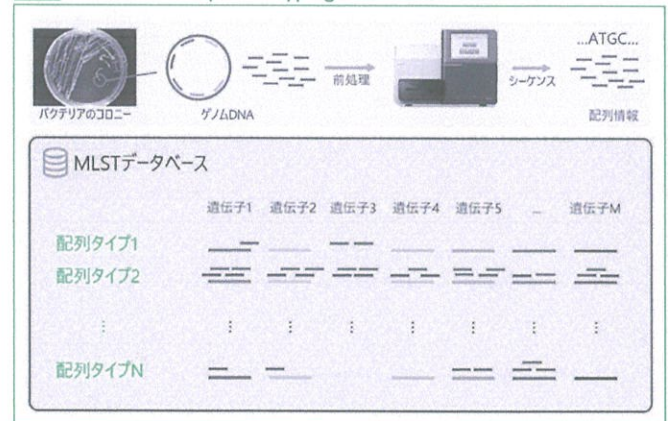
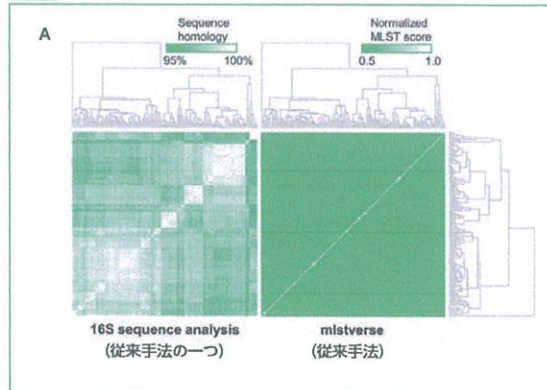


図2 同定手法別 NTM175種同定の感度・特異度[※]



※MLST解析において、標的病原体に対する高スコアは感度の高さを、標的以外の病原体に対する低スコアは特異度の高さを表す

図4 NTM迅速その場同定システムの概要

