

■受領No.1374

## 薬剤耐性菌の迅速な定量プロファイリング技術の開発

代表研究者

今西 規 東海大学 医学部医学科基礎医学系分子生命科学 教授



## 1. 研究目的

細菌感染症の治療にはさまざまな抗菌薬が使用されるが、薬剤の効かない薬剤耐性菌や、複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌が蔓延しており、世界的に深刻な事態となっている。耐性菌が出現する原因は、主に、抗菌薬の過剰な使用によって感染細菌が耐性を獲得しているためだと考えられている。医療機関において患者サンプルに含まれる細菌の種とその薬剤耐性プロファイルを決定するには、通常は細菌培養検査が用いられる。しかし、検査結果を得るまでには2日以上を要し、難培養性の細菌も存在するため、正確な判定結果を得ることは容易ではない。そのため、迅速かつ正確に薬剤耐性菌の耐性プロファイルを決定するための新しい検査技術が必要とされている。そこで本研究では、われわれが独自に開発した迅速かつ高

精度なゲノム解析システム (図1) を基盤として、未知の薬剤耐性菌の細菌種と耐性プロファイルを迅速に判定することができる新技術を開発する。細菌培養検査に依存せず、医療現場内で3時間以内に耐性菌を正確に判定できるようにすることをめざす。

これと並行して、16S rRNA遺伝子解析にランダムDNAバーコードを導入し、PCRバイアスを補正して絶対定量を可能にする新技術の開発をめざす。これらの新技術を開発したら、その実用化をめざしてゲノム解析システムの更新を進める。これを細菌感染症の診断補助ツールとして東海大学医学部付属病院で試験運用することにより、感染症に対するゲノム診断システムを医療機器として実用化することが本研究の最終目的である。

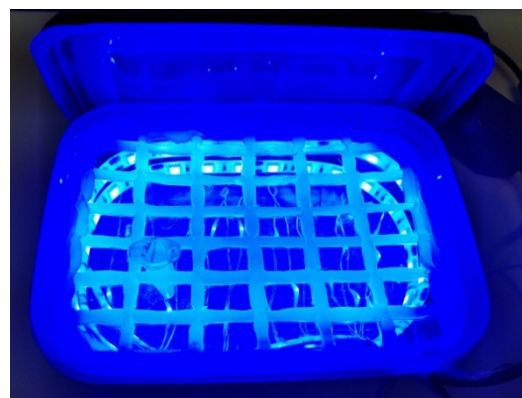
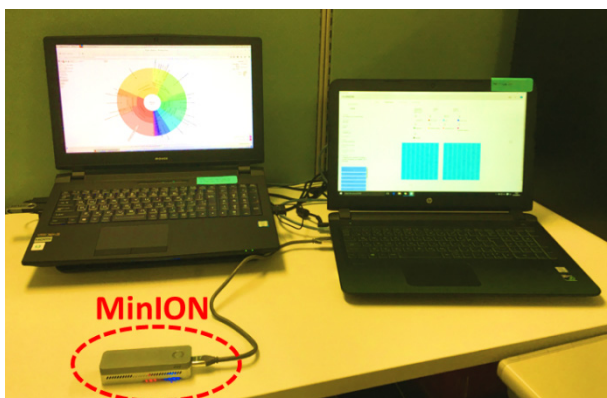


図1 感染症診断のためのゲノム解析システム (左) と青色 LED 照射装置 (右)。ナノポア・シーケンサーMinION と 2 台の高性能ラップトップ型 PC およびソフトウェア群で構成される独自のシステムであり、2 時間以内に細菌種の同定が可能である。青色 LED は PMA の結合反応に使用する。

## 2. 研究概要

培養を行わずに迅速に細菌種と薬剤耐性プロファイルを決定する新技術の開発を試みた (図2)。薬剤耐性菌を含む試料を分注してそれぞれに異なる抗菌薬を投入し、一定時間後に選択的膜透過性色素 (PMA) を投入してLED光を照射することにより、死菌由来DNAを化学修飾する。これをPCRで増幅すると、薬剤耐性を持つ生菌のDNAのみが選択的に増幅される。以上の処理後に、ナノポアDNAシーケンサーMinIONを使った独自のゲノム解析システムで細菌の種組成を決定した。

本手法の有効性を検証するため、大腸菌ATCC株、緑膿菌PAO1株、多剤耐性緑膿菌MDRPを用意した。このうちPAO1株はアンピシリン (Amp) に耐性を示し、MDRP株はアンピシリンおよびゲンタマイシン (GM) に耐性を示す。大腸菌ATCC株は耐性がない。まず、大腸菌ATCC株と緑膿菌PAO1株の混合液に対して、抗菌薬なし (No Drug)、アンピシリン処理 (Amp-1およびAmp-2)、ゲンタマイシン処理 (GM-1およびGM-2) を行い、その後PMAを使って生菌の組成をゲノム解析により調べた (図3A)。その結果、薬剤耐性を持つ菌の割合が予想通りに増加していることが明らかになった。次に、大腸菌ATCC株と多剤耐性緑膿菌MDRPの混合液に対して、抗菌薬なし (No Drug)、アンピシリン処理 (Amp-1およびAmp-2)、ゲンタ

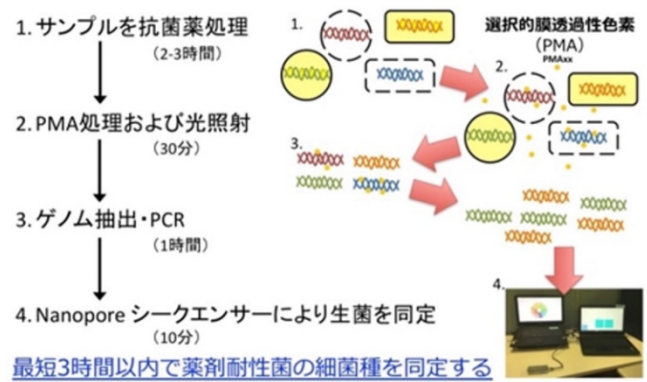


図2 薬剤耐性菌に対する迅速な細菌種判定技術の開発。試料を抗菌薬で処理後、PMA に生菌と死菌を区別して、生菌のみをゲノム解析にかける。

マイシン処理 (GM-1およびGM-2) を行い、生菌の組成をゲノム解析により調べた (図3B)。この場合も予想通りに、薬剤耐性を持つ菌の割合が増加していることが明らかになった。

以上の実験により、抗菌薬とPMAによる処理とゲノム解析の組合せにより、細菌種とその薬剤耐性プロファイルを同時に決定できることが示された。この手法のアドバンテージは、最短で3時間程度で薬剤耐性菌の細菌種を同定できることである。今後は、安定的にさまざまな薬剤への耐性菌を判別可能なプロトコルを完成させ、実用化をめざしたい。以上の結果について、論文発表を準備中である。

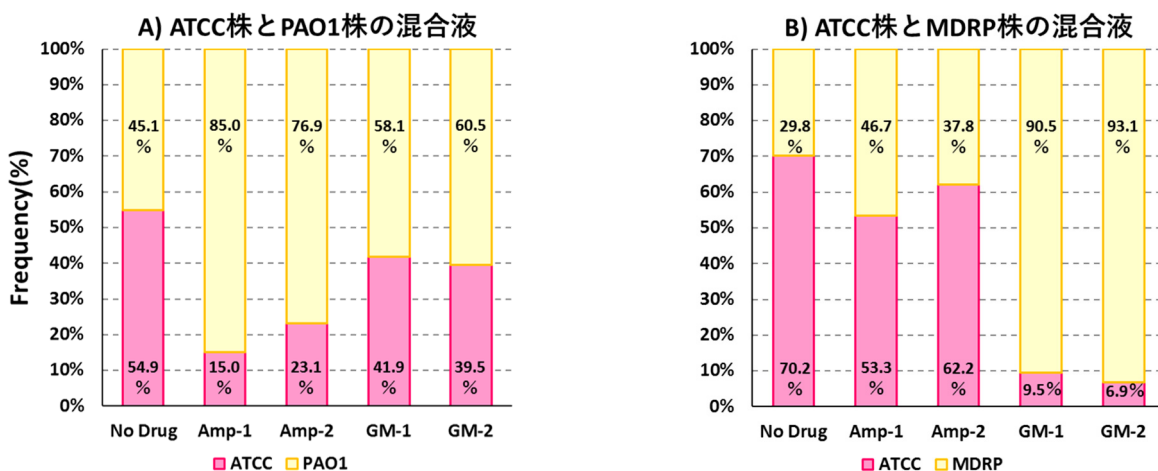


図3 抗菌薬処理後の生菌の組成。A)は大腸菌 ATCC 株 (耐性なし) と緑膿菌 PAO1 株 (アンピシリン耐性) の混合液、B)は大腸菌 ATCC 株と多剤耐性緑膿菌 MDRP の混合液に対する実験結果を示す。

このほか、ランダムDNAバーコードを使った16S rRNA遺伝子の絶対定量解析について研究を行った。本手法のProof-of-concept実験には成功したが、コスト面や実験に要する時間の面では著しく不利であることが判明し、実験方法を再検討した。今後は、濃度が既知の遺伝子配列を試料に混入させて解析するスパイク・イン方法など、相対的な濃度測定の方法を開発していく方針である。

### 3. 発表 (研究成果の発表)

#### 【学会講演会への発表】

1. 今西 規、「迅速ゲノム解析と人工知能を用いた感染症診断支援システムの開発」、**第3回感染症診断と治療におけるゲノム解析** (東海大学伊勢原校舎、2020年)
2. 大野 歩、梅澤 和夫、クリュコフ キリル、中川 草、浅井 さとみ、宮地 勇人、今西 規、「ナノポアDNAシーケンサーを用いた薬剤耐性菌同定技術」**第42回日本分子生物学会年会** (福岡、2019年)
3. 大野 歩、梅澤 和夫、浅井 さとみ、クリュコフ キリル、中川 草、宮地 勇人、今西 規、「Rapid profiling of drug-resistant bacteria using propidium monoazide and a nanopore DNA sequencer.」**第93回日本細菌学会総会** (名古屋、2020年)
4. Imanishi T, "Bioinformatics for the diagnosis of infectious diseases", **The 17th Asian Bioinformatics Consortium Symposium 2019** (Guizhou, China, 2020)

#### 【学会誌への発表】

1. Ishihara T, Watanabe N, Inoue S, Aoki H, Tsuji T, Yamamoto B, Yanagi H, Oki M, Kryukov K, Nakagawa S, Inokuchi S, Ozawa H, Imanishi T. Usefulness of next-generation DNA sequencing for the diagnosis of urinary tract infection. *Drug Discov Ther.* 14(1):42-49 (2019)

2. Nakagawa S, Inoue S, Kryukov K, Yamagishi J, Ohno A, Hayashida K, Nakazwe R, Kalumbi M, Mwenya D, Asami N, Sugimoto C, Mutengo MM, and Imanishi T. Rapid sequencing-based diagnosis of infectious bacterial species from meningitis patients in Zambia. *Clinical & Translational Immunology* 8(11): e01087 (2019)