

ナノポア型シーケンサーを用いた 発熱性好中球減少症の病態解明

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	サカイ ジュン 酒井 純
所属等	埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科 助教
プロフィール	平成 23 年 3 月 埼玉医科大学医学部医学科を卒業。医師免許取得後、同年から 2 年間、埼玉医科大学国際医療センターにおいて初期臨床研修を修了した。その後、埼玉医科大学大学院 医学研究科 博士課程に入学。国立感染症研究所真菌部協力研究員を兼任し、真菌学の研究に従事した（新規抗真菌薬に関する研究）。平成 30 年 3 月、同大学院博士課程を修了し、博士（医学）の学位を取得した。その後、埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科に入局。以後、一貫して感染症の遺伝子診断学の開発のほか、真菌感染症の病態解明を目指したトランスレーショナル・リサーチに取り組んでいる。

1. 研究の概要

発熱性好中球減少症（以下 FN）は、血液疾患や、生物学的製剤などの薬剤を契機に、極度の好中球減少に陥ることで、何らかの感染症を引き起こした状態をいう。宿主の免疫機能が低下している状態であるため、早期診断・早期適正治療が行われなければ、予後不良になりうる。しかし、FN 患者の病態解明は遅れている。特に急性白血病寛解導入時や造血幹細胞移植の患者で FN をきたした場合、その 10% 未満の例で血液培養が陽性となり、20~30% で肺炎などの感染巣が臨床的に確認でき、残りの大多数の症例は原因不明のままとされる。また、次世代シーケンス技術(NGS)を用いたこれまでのメタゲノム解析のほとんどが、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析に基づいており、ウイルスや真菌の関与を明らかにすることはできない。

我々は、FN と臨床診断された際に採取した末梢血培養検体を用い、ナノポア型・ポータブル・シーケンサー（以下 MinION）を用いて微生物叢を解析することにより、FN の病態解明と原因病原体の同定を試みた。MinION はノート型 PC で制御可能であり、シーケンスのコアユニットが使い捨てである。そのため、高額な研究機器を事前に準備する必要がなくゲノム解析が可能であるうえ、シーケンス・データをクラウドネットワーク上でリアルタイムに解析することができる。本方法は、新興・再興感染症も網羅した幅広い感染症診断診断に活用可能であり、医療資源に乏しい環境においても実施可能であることは、今後の発展性が高い基盤技術であるといえる。本技術を用いた新たな診断技術により、FN の起因菌の早期診断・早期治療が可能か検証することが最終目標となる。その先行研究として我々は、菌血症症例において、MinION の菌同定能が従来の検査法と比較して、有効な検査法になりうるか、比較し検証する。

2. 研究の動機、目的

着想に至る動機

FN は患者死亡につながる致死的な緊急症のひとつであり、培養検査での原因微生物の同定が極めて困難であるため、抗菌薬の適正使用の実践は難しい。実際、広域抗菌薬が長期間継続されることが多く、培養検査で菌種が同定されない以上、抗菌薬の de-escalation が行われないことから、結果として FN に対する経験的治療が耐性菌を生み出し、医療費の高騰を招いている。しかも、感染症治療が長期化すれば、がん化学療法中の継続が困難となり、患者の生命予後は一層悪化する。我が国では医療施設での NGS の配置は諸外国に比べて遅れており、その成果を臨床の現場で活用し、直接的に治療へ活かすためには、ソフト・ハードの両面から困難を生じている。

以上のことから、取り扱いが簡単で、メンテナンスが不要な使い捨てタイプの MinION の活用が解決への突破口となると考えた。本研究の成果が、培養検査による原因病原体の同定が困難な FN 患者に対する抗菌薬の適正使用を実現させ、患者の予後改善と耐性菌の出現の抑制に貢献し、医療費の低減につながることを目標に掲げ、本研究を着想した。

目的

FN の病原体診断を可能にする技術を開発し、抗菌薬の適正使用を実現させ、患者の予後を向上させるとともに、効率的な医療資源の使用に貢献する。がん化学療法中に FN と診断された患者末梢血を用い、メタゲノム解析を行う。その結果、病態形成に関与する病原体を網羅的に解析し、適切な抗菌薬・抗真菌薬の使用を可能にすることで、患者の死亡率を低下させ、安全ながん化学療法を可能にする。さらに、FN に関与する病原体のゲノム疫学解析を行い、FN の病態解明を試みる。

本研究の先行調査として、血流感染症の症例における MinION の菌種同定能を、従来の質量分析装置 (MALDI-TOF MS) ・ 16S rRNA sequencing の結果と比較・検証する。

3. 研究の結果

16S rRNA sequencing と MALDI-TOF MS と比較した、MinION の菌種同定能 (Table 1)

当院細菌検査室に提出された血液培養ボトル陽性症例 38 例 (グラム陰性菌, GNR 18 例; グラム陽性菌, GPC 20 例) を MinION にて菌種の同定を行い、MALDI-TOF MS、16S rRNA sequencing との結果と比較した。

GNR では、MinION による同定結果はすべて MALDI-TOF MS による判定結果と一致したが、16S rRNA sequencing では 1 検体のみ MinION で *Klebsiella*

variicola と判定した検体について *K. pneumoniae* と判定された。GPC では、MinION の MALDI-TOF MS と 16S rRNA sequencing との一致率は 60.0%に留まった。とりわけ *Staphylococcus caprae*, *S. aureus* の同定能が低く (42.8%, 0%)、菌種により陽性的中率に差が見られた。

Table 1. Comparison of the identification results with MALDI/TOF MS, 16S rRNA sequencing and MinION sequencing.

Pathogens	Detection rate	
	MALDI-TOF MS	16S rRNA sequencing
GNR(n=18)	18 / 18 (100 %)	17 / 18 (94.4 %)
GPC (n=20)	12 / 20 (60.0 %)	12 / 20 (60.0 %)

Extended-spectrum β lactamase の同定 (Table 2)

MinION でのシーケンス解析ソフト Epi2ME の ARMA workflow にてグラム陰性菌の同定能の際に抽出された ESBL 遺伝子と、菌株の薬剤感受性試験結果を検証した。薬剤感受性試験

は、CLSI (document M100-S27)の基準にて ESBL 産生菌かを判定した。

No.9 の *Escherichia coli* において、CTX-M33 型を検出した。同株は、他 *E. coli* 株と異なり、薬剤感受性試験にて ESBL 産生菌と判定された。*K. pneumoniae* 株 3 菌株は、うち 2 菌株 No.14 と No.15 の株で SHV-143、SHV-66 と SHV-143 を検出した。薬剤感受性試験にて、ESBL 産生菌と判定されたものは、No.15 のみであった。SHV-143 は *K.*

pneumoniae の染色体内に存在している遺伝子であり、非 ESBL 遺伝子であった。

ESBL 遺伝子は ESBL 産生菌と判定された 2 例中 2 例で同定されたため、ESBL 産生菌の迅速同定検査法としての可能性があると考えられた。

4. これからの展望

本研究により、MinION による血液培養ボトル陽性検体の菌種同定ならびに耐性菌判定の可能性を示した。今後は、FN と臨床診断された際に採取した末梢血を直接的に検体として用い、MinION を用いた微生物叢の解析技術の実用化を目指す。特に GPC におけるシーケンス精度に、DNA の精製度が大きく影響することが明らかとなった。そのため、最適なゲノム DNA ならびにプラスミド DNA の抽出方法にて、さまざまな方法を検証し、MinION によるシーケンス精度の向上を諮る。さらに、菌種同定にとどまらず、染色体ならびにプラスミド上に存在する抗菌薬耐性に関わる遺伝子の有無、あるいは SNP 解析を試み、病原体の質的診断まで可能にできるように開発をすすめる。解析データの蓄積がすすめば、患者の臨床情報 (先行する抗菌薬投与の有無、好中球数、基礎疾患、がん化学療法メニュー) とメタゲノム解析の結果について統計学的検討を行い、FN の病態解明とともに、FN に対する経験的治療の際の抗菌薬選択に関するエビデンスの確立を目指す。

5. 社会に対するメッセージ

我々は、今回の研究成果を土台とし、FN 患者の医療に貢献できる実用的な臨床検査技術として開発を目指すとともに、さまざまな医療分野での貢献を目指し努力する。

Table 2. Comparison of ESBL *bla* genes by ARMA results and PCR amplification

Species	Isolate no.	ARMA workflow	Routine methods	
			PCR	Disk diffusion
<i>Escherichia coli</i>	5	None	-	Non-ESBLs
	6	None	-	Non-ESBLs
	7	None	-	Non-ESBLs
	8	None	-	Non-ESBLs
	9	CTX-M33	CTX-M (+)	ESBLs
	10	None	-	Non-ESBLs
	11	None	-	Non-ESBLs
	12	None	-	Non-ESBLs
	13	None	-	Non-ESBLs
<i>K. pneumoniae</i>	14	SHV-143	SHV (+)	Non-ESBLs
	15	SHV-66, 143	SHV (+)	ESBLs
	16	None	-	Non-ESBLs