

# 病原菌の新規同定法の開発に成功

## 検体の採取から最短2時間で感染細菌を特定可能に

### 【本件のポイント】

- 従来の培養検査の欠点を補う迅速な細菌同定法を確立
- ICUなど臨床現場の最前線で遺伝子検査が可能に
- 本学研究医養成コース履修の学生が論文を発表

学校法人関西医科大学（大阪府枚方市 理事長・山下敏夫、学長・友田幸一）附属生命医学研究所（所長・木梨達雄）侵襲反応制御部門の松尾禎之講師、廣田喜一学長特命教授らの研究チームは、東海大学などと共同で新しい原理を用いた細菌同定法の開発に成功しました。

研究チームは東海大学医学部情報生物医学研究室今西規教授らが開発した遺伝子解析システム（Mitsuhashi *et al.* Sci Rep 2017 7:5657 PMID:28720805）に基づき、検体の処理方法を簡便化するなどの改良を加え、ICUなどの医療現場で迅速に感染細菌を同定できる診断法を確立。核酸配列の解読に基本的な実験手技以外に高度な技術を必要としないシーケンサーMinION™を活用することで、検体の取得からわずか2時間程度で感染細菌の同定ができることを示しました。臨床検体を用いたシーケンス解析は、本学の研究医養成コースを履修している医学部学生によって行われ、下記論文を筆頭著者として執筆・出版（「JA Clinical Reports」）しました。本研究は文部科学省 私立大学研究ブランディング事業、関西医科大学学内助成、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）、日本麻酔科学会ピッチコンテストの支援を受けています。

### ■ 「FEBS Open Bio」掲載概要

掲載誌	FEBS Open Bio DOI: 10.1002/2211-5463.12590
論文タイトル	Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer.
筆者	Shinichi Kai, Yoshiyuki Matsuo, So Nakagawa, Kirill Kryukov, Shino Matsukawa, Hiromasa Tanaka, Teppei Iwai, Tadashi Imanishi, Kiichi Hirota

### ■ 「JA Clinical Reports」掲載概要

掲載誌	JA Clinical Reports DOI: 10.1186/s40981-019-0244-z
論文タイトル	Real-time diagnostic analysis of MinION™-based metagenomic sequencing in clinical microbiology evaluation: a case report.
筆者	Hiromasa Tanaka, Yoshiyuki Matsuo, So Nakagawa, Kenichiro Nishi, Akihisa Okamoto, Shinichi Kai, Teppei Iwai, Yoshiteru Tabata, Takeshi Tajima, Yuji Komatsu, Motohiko Satoh, Kirill Kryukov, Tadashi Imanishi, Kiichi Hirota

### ■ 「Intensivist」掲載概要

掲載誌	Intensivist
論文タイトル	MinION™を使ったクリニカルシーケンシングが拓く病原菌同定の新スタンダード
筆者	甲斐慎一、松尾禎之、廣田喜一

### 【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

**PRESS RELEASE**



なお今回の研究成果について、迅速細菌同定法の原理に関する論文が米国科学誌「FEBS Open Bio」に1/19（土）付で、本手法の臨床応用について本学学生が執筆した英文論文が科学誌「JA Clinical Reports」に3/19（火）付で、また以上の内容をまとめた日本語総説が雑誌「Intensivist」に4/26（金）付で、それぞれ掲載されました。 ※...各専門用語の詳細は、文末「用語解説」をご参照ください

## < 本研究の背景 >

感染症管理では予防とともに早期から適切な抗菌薬を投与することが肝要であり、できるだけ迅速な病原菌の同定が望ましいとされています。しかし、現在のスタンダード検査である細菌培養法は結果を得るのに数日を要し、培養が困難な細菌には対応できないなどの問題点があります。こうした理由から起因菌の同定を待たずに、経験に基づいて抗菌薬が選択されることの多いのが現状です。

また、培養に依存しない検査手法として、全ての細菌が有する16SリボソームRNA（16S rRNA<sup>\*1</sup>）を識別に利用し、遺伝子の配列をシーケンシングすることによって幅広い系統の細菌を高精度に同定する方法が開発されています。ただ、このシーケンス解析は高額な大型機器を必要とし、検体の処理から配列データの取得までに1~2日かかるなど、いずれも医療現場への普及に必要な水準を満たすものではありませんでした。そこで今回の研究では、全く新しい原理に基づく小型シーケンサーMinION<sup>TM\*2</sup>を用いて、検体の取得から数時間以内に細菌の同定を可能にする診断技術の確立を試みました。

## < 本研究の概要 >

16S rRNA 遺伝子解析では、細菌のゲノムDNAを抽出し、PCR法<sup>\*3</sup>により16S rRNA 遺伝子の増幅を行います。従来行われていた煩雑な細菌ゲノムDNAの精製操作を簡略化し、セラミックビーズで処理した細菌懸濁液を直接PCR反応に用いることで大幅な時間短縮を実現しました。また、DNA精製を行った場合と比較しても、菌種同定の精度に大きな変化は認められませんでした。

続いて急性呼吸窮迫症候群患者から採取した気道分泌物を用い、通常の細菌培養検査およびMinION<sup>TM</sup>を用いた16S rRNA 遺伝子解析を実施。培養検査が感染菌の検出に2日間を要したのに対し、MinION<sup>TM</sup>によるシーケンシングでは検体取得後2時間程度で感染菌を種レベルで同定することに成功しました。培養により検出された菌種に加え、MinION<sup>TM</sup>による16S rRNA 遺伝子配列解析では、新たに複数種の細菌の存在が確認されており、検査の迅速化のみならず検出感度の観点からも本技術の優位性を示す結果となりました。

### 【本件取材についてのお問合せ】

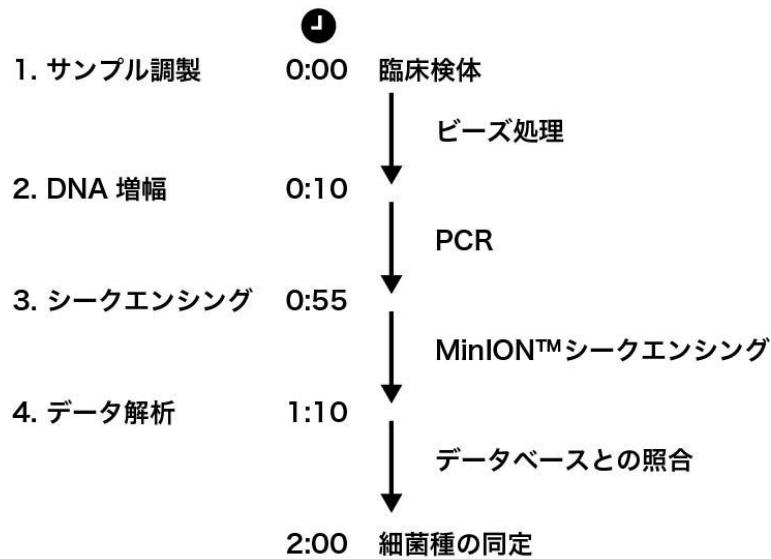
学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

PRESS RELEASE

MinION™シーケンサーを用いた迅速細菌同定法



<本研究の意義>

本技術は検体からのDNA精製を前提とした従来の手法に比べ、極めて短時間で簡便かつ高精度な細菌種の同定が可能です。また、高額な大型実験装置を必要とせず、手術室など臨床現場での細菌検査に適したポータビリティを備えている点において、感染症診断に大きな変革をもたらす可能性を秘めていると研究チームでは考えています。将来的に、病原菌同定を目的とした検査の精度と迅速性がさらに向上すれば、より適切な抗菌薬治療が可能となり、患者さんの状態が改善したり死亡率が低減したりと、医学・医療に大きく寄与すると考えられます。今後、16S rRNA 遺伝子を用いた遺伝子解析検査が従来の細菌培養法を用いた検査を補完する形で、病原菌同定の有用なツールとなっていくことが期待されます。

新しい技術を診断や治療に役立てるためには基礎医学研究が欠かせません。本学の研究医養成コースは臨床医となるための教育に加え、将来基礎医学研究を遂行できる医師の養成を目的として設置されました。今回、当コースを履修する医学部生によって行われた研究が学術論文として公刊されたことは、研究医養成コースが掲げる教育理念を体現し、人材育成の点からも非常に意義のある成果と言えます。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

リリース先：大阪科学・大学記者クラブ、文部科学記者会、  
科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ

2019年5月29日

No. 00121



## PRESS RELEASE

### <研究チーム>

関西医科大学 附属生命医学研究所 侵襲反応制御部門

医学部学生：田中宏昌（研究医養成コース）

講師：松尾禎之

研究員：西憲一郎（大阪赤十字病院）

研究員：岡本明久（大阪赤十字病院）

研究員：岩井鉄平（枚方公済病院）

医学部学生：田畑凱光（研究マインド育成プログラム）

学長特命教授：広田喜一

京都大学 医学部附属病院 麻酔科

助教：甲斐慎一

大学院生：松川志乃

東海大学医学部 分子生命科学 情報生物医学研究室

講師：中川草

研究員：Kirill Kryukov

教授：今西規

明生病院

医師：田島剛史

医師：小松優治

医師：佐藤元彦

### 【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

## 用語解説

### 1. 「16S リボソーム RNA」

リボソームは RNA とタンパク質から成る複合体で、細胞内におけるタンパク質合成の場として知られています。細菌のリボソームを構成する RNA のうち、16S リボソーム RNA (16S rRNA) をコードする遺伝子は約 1,500 塩基から構成され、個々の細菌種によって配列の異なる可変領域と種間で高度に保存された共通の領域が混在しており、系統分類におけるマーカーとして用いられています。保存された共通部分に PCR プライマーを設計すれば、検体中に存在する細菌群全体を標的とした 16S rRNA 遺伝子の増幅が可能です。増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、保存領域に挟まれて存在する可変領域の種特異性を利用して、データベースと照合することで細菌種を特定できます。

### 2. 「MinION™」

Oxford Nanopore Technologies 社 (ONT 社) が開発した新しいシーケンサー「MinION™」は、携帯電話よりも小さくパソコンに USB 端子を介してつなぐことでシーケンシングが可能となる製品です。シーケンサー内部に蛋白質の小さい孔 (ナノポア) が配置されており、ナノポアを各塩基 (A, T, G, C) が通過するとき発生する電流の変化を測定し、各



塩基に特徴的な波形データから人工知能を用いたアルゴリズムによって DNA 配列を決定します。シーケンシングが可能な配列の長さに関して事実上の限界が存在せず、リアルタイムにデータが出力されシーケンシングと平行して、データ解析に移ることができるなどの特徴を持っています。

### 3. 「PCR 法」

DNA を合成・増幅するための手法で、Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応) の頭文字から名付けられています。極めて微量な DNA 溶液からでも、任意の DNA 断片だけを増幅させることが可能なのが特徴です。また、所要時間も数十分から 2 時間程度と短く、全自動の卓上用装置で実施できるなど、メリットの多い方法として様々な場面で活用されています。

#### 【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp