

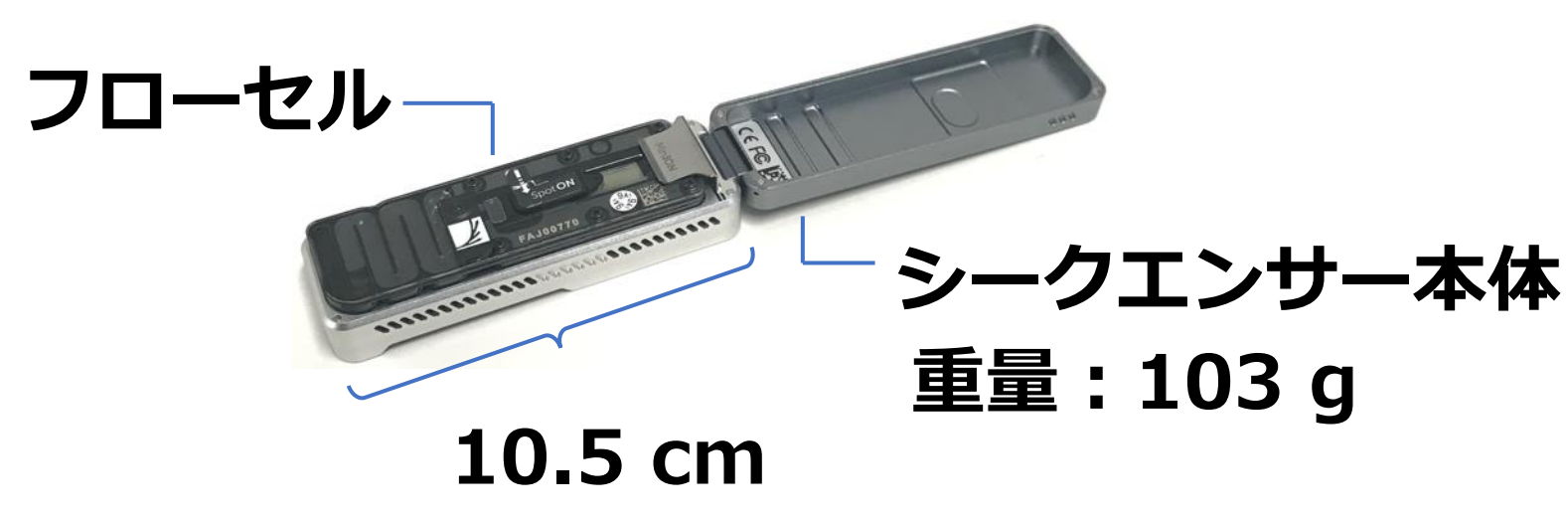
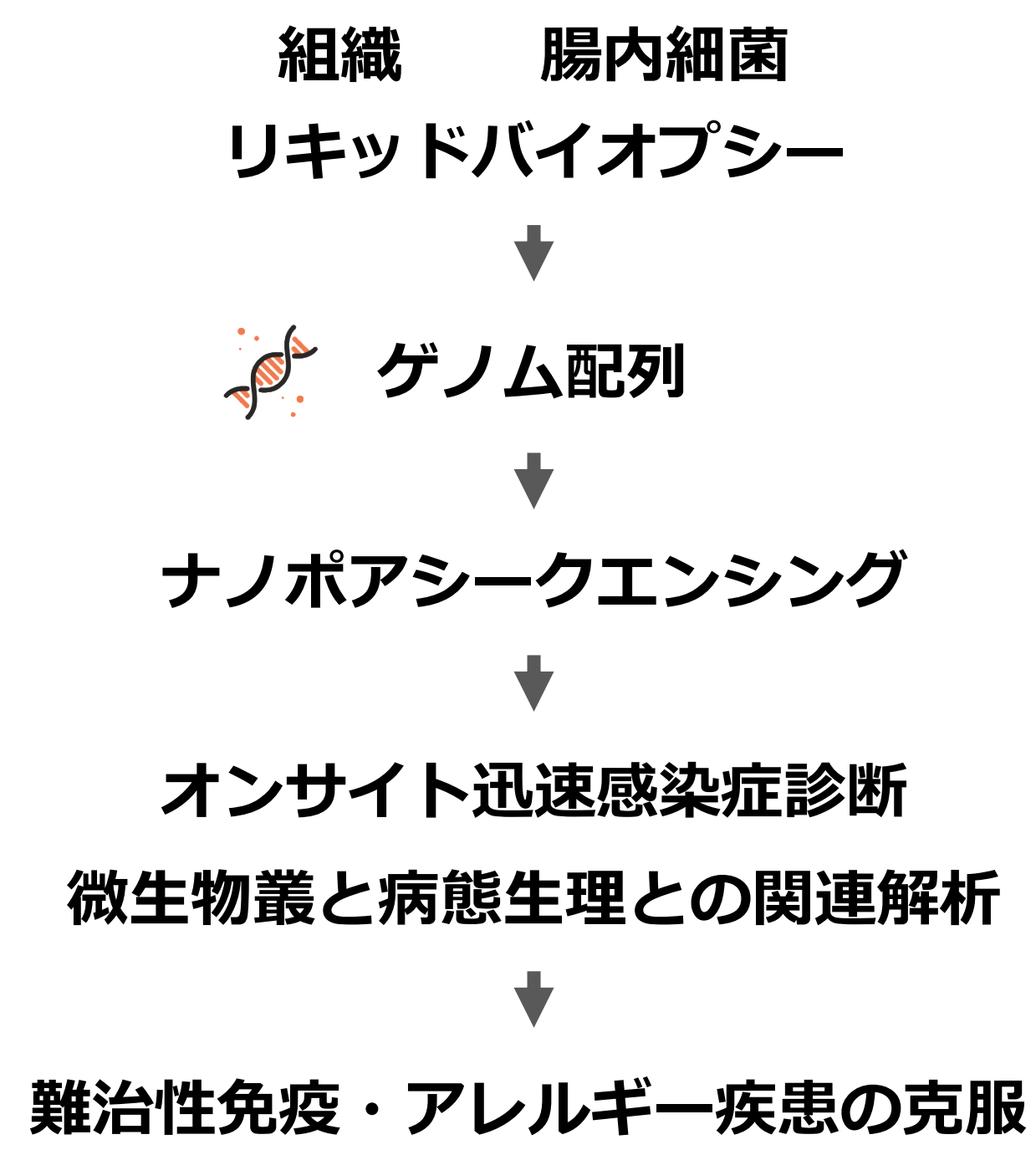
ナノポアシークエンサーを用いたオンサイト迅速微生物同定技術の開発 - 感染症診断と細菌叢解析への応用 -

所属：附属生命医学研究所 侵襲反応制御部門

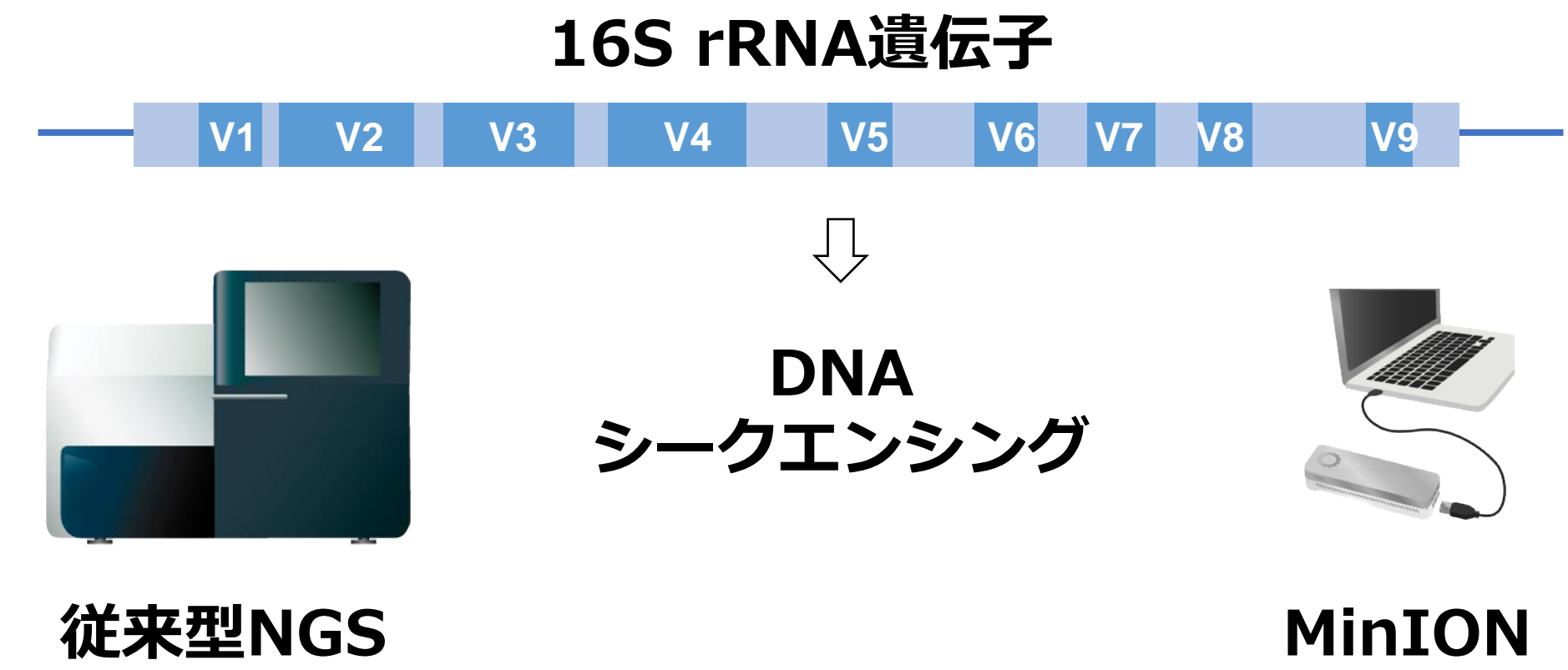
参加者氏名：松尾 禎之, 廣田 喜一

領域横断的臨床ゲノム研究

ナノポアシークエンサーMinIONを用いた微生物同定法



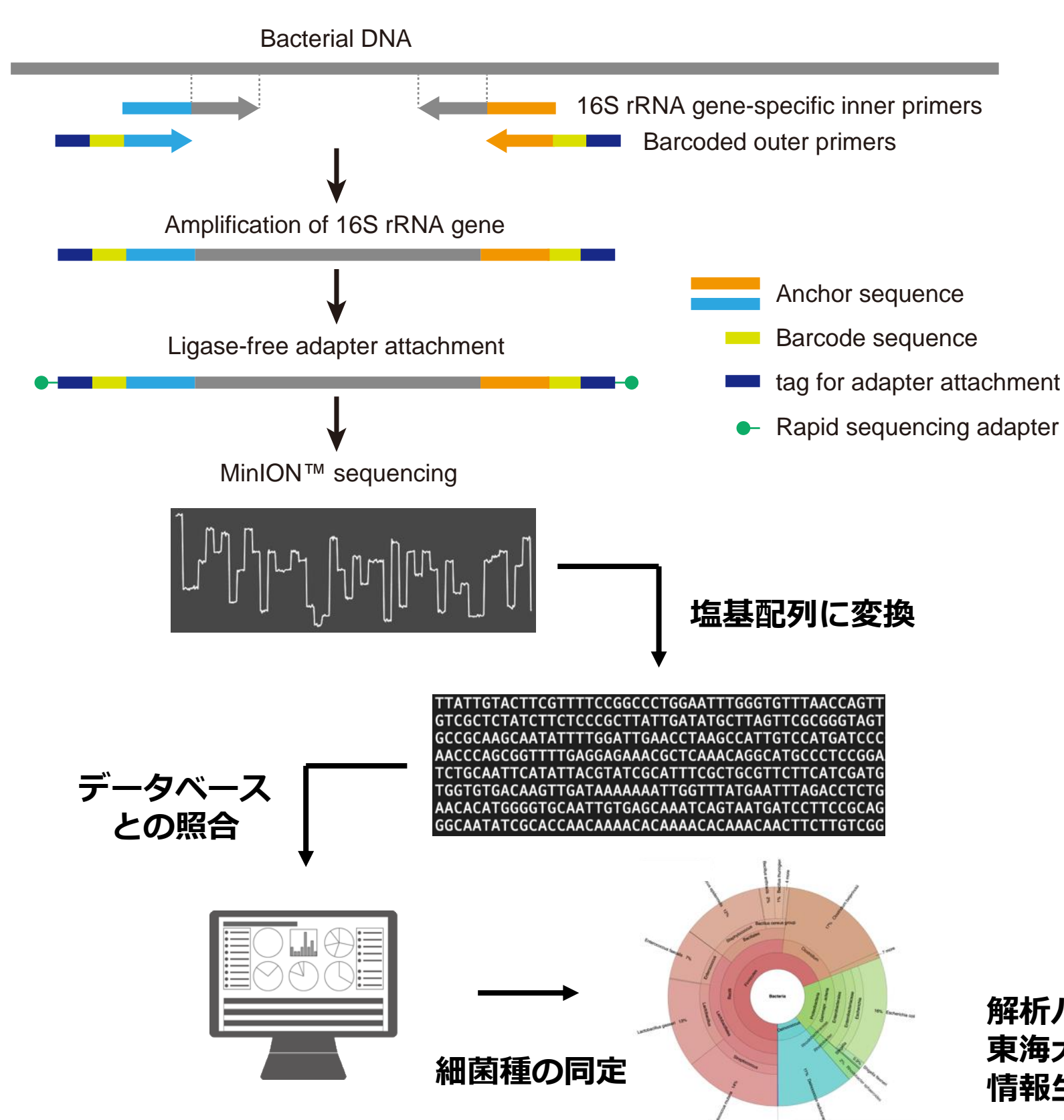
- DNAがポアを通過する際に生じる各塩基に特徴的な電流の変動を測定
- 小型・低価格
医療現場でシーケンシング可能
- 長い配列の解読が可能なロングリード
シーケンサー (>100万塩基)
- リアルタイムデータ解析



- 解読可能な配列長が短い (2 x 250塩基)
- 配列の取得に時間を要する (実行時間: ~40時間)
- 種レベルの系統分類は困難

- 一度に全長領域1500塩基を解読
配列情報が格段に増し細菌の判別に有利
- ランの途中でもデータ解析に移行可能
細菌同定に要する時間を大幅に短縮
- 高精度かつ迅速な細菌同定を実現

16S rRNA遺伝子解析による迅速細菌同定ワークフロー



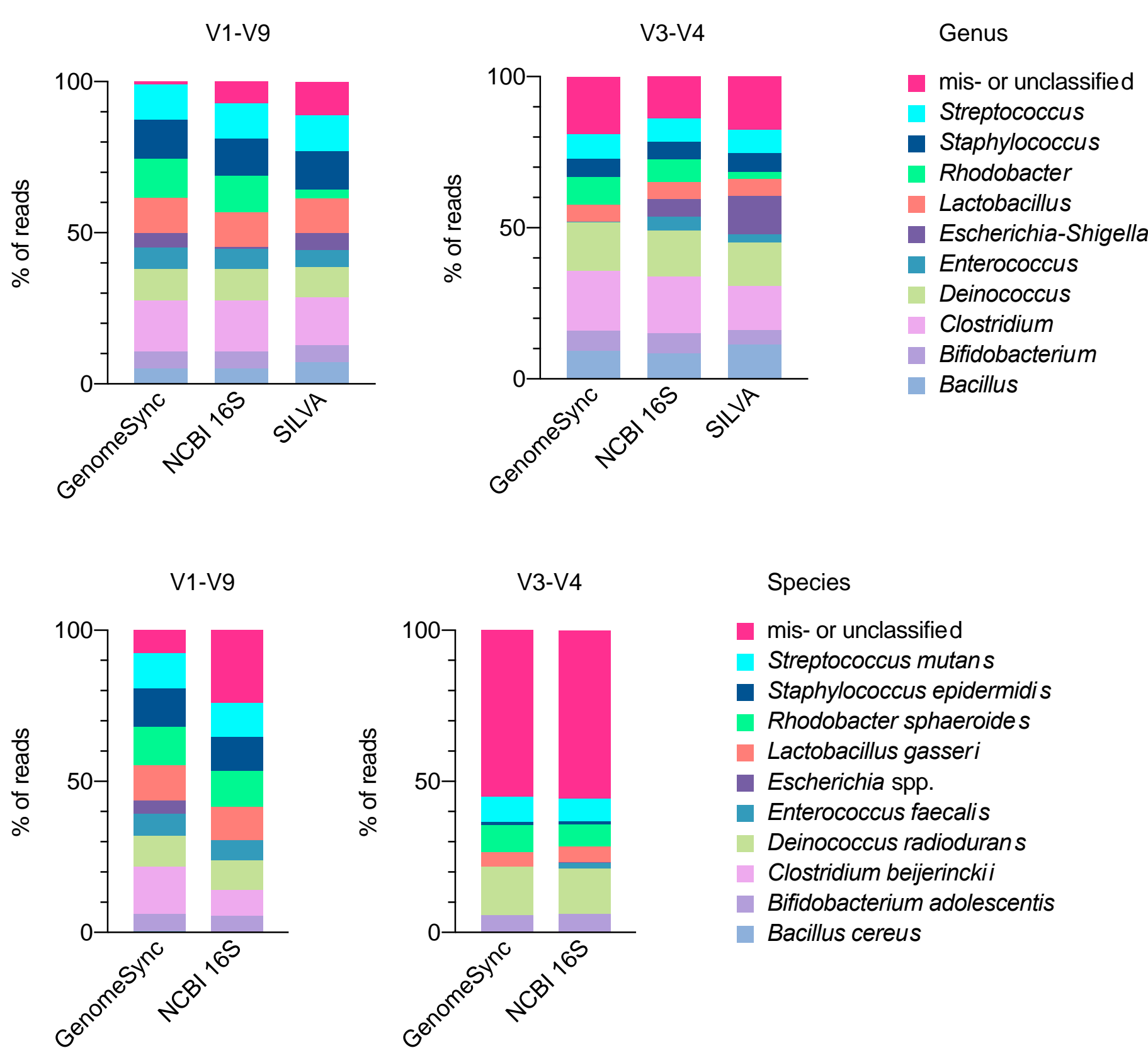
ステップ	検体	時間
1. サンプル調製	DNA抽出	60 min
2. DNAの増幅	PCR 精製・アダプター付加	45 min 15 min
3. シーケンシング	ライブラリ調製 MinIONシーケンシング	10 min 20 min
4. データ解析	データベースとの照合	30 min
細菌種の同定		Total ~3 hr

適用例1. 臨床検体 (感染症例)

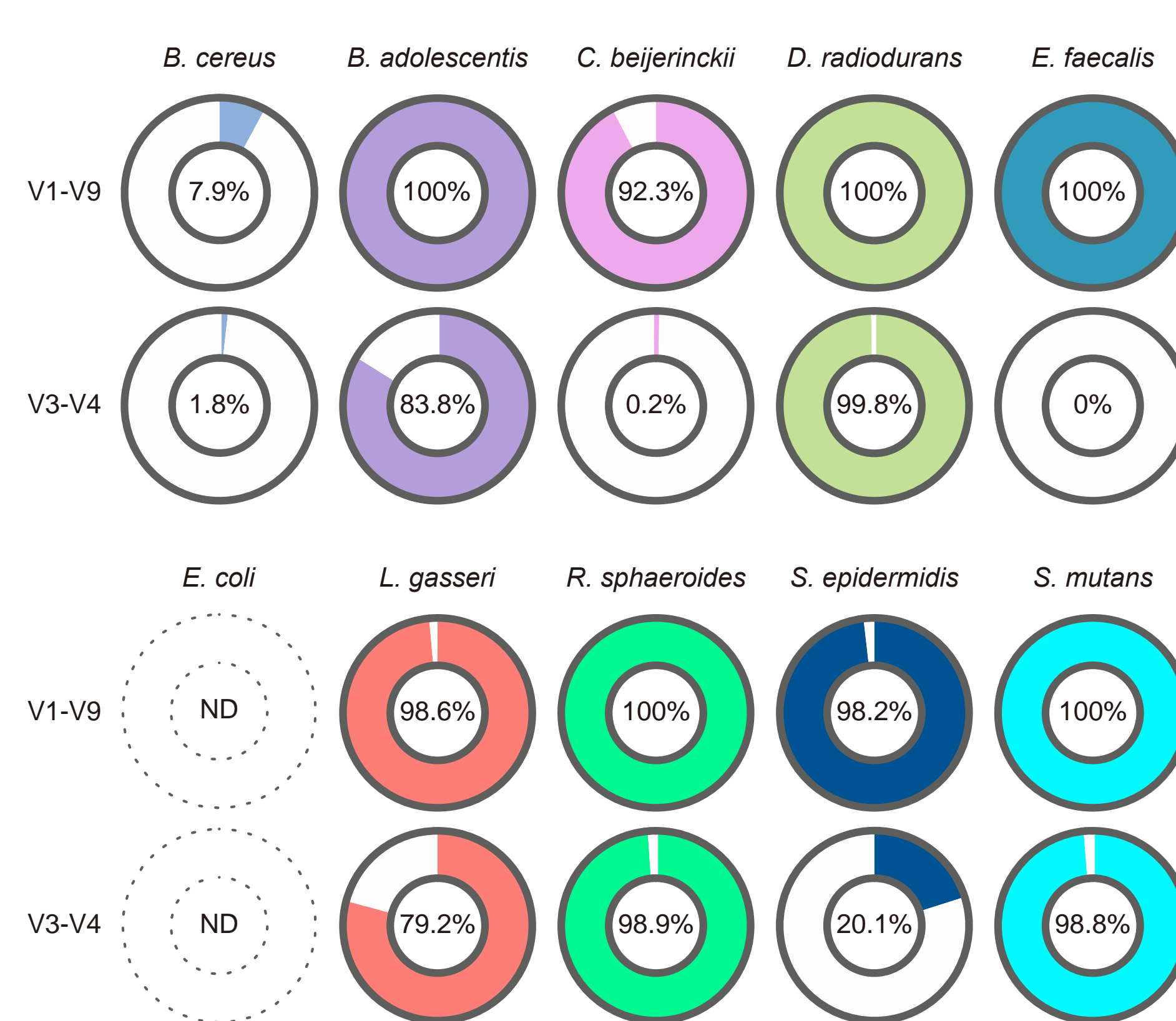
検体	MinION Seqで同定された細菌	培養検査結果
喀痰 (ARDS)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 他	<i>S. Maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i>
脊椎インプラント	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
膿 (壊死部)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> 他	未実施
膿 (壊死部)	<i>Escherichia coli</i>	未実施
膿 (スワブ)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	未実施
膿胸	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	未実施
関節液 (人工関節)	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>S. anginosus</i>
角膜炎 (擦過物)	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	<i>Moraxella</i>
眼内炎 (硝子体液)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>

適用例2. Mock community (10種の細菌DNA混合物) を用いた解析手法評価

解析領域 (V1-V9, V3-V4), データベース (3種) の比較



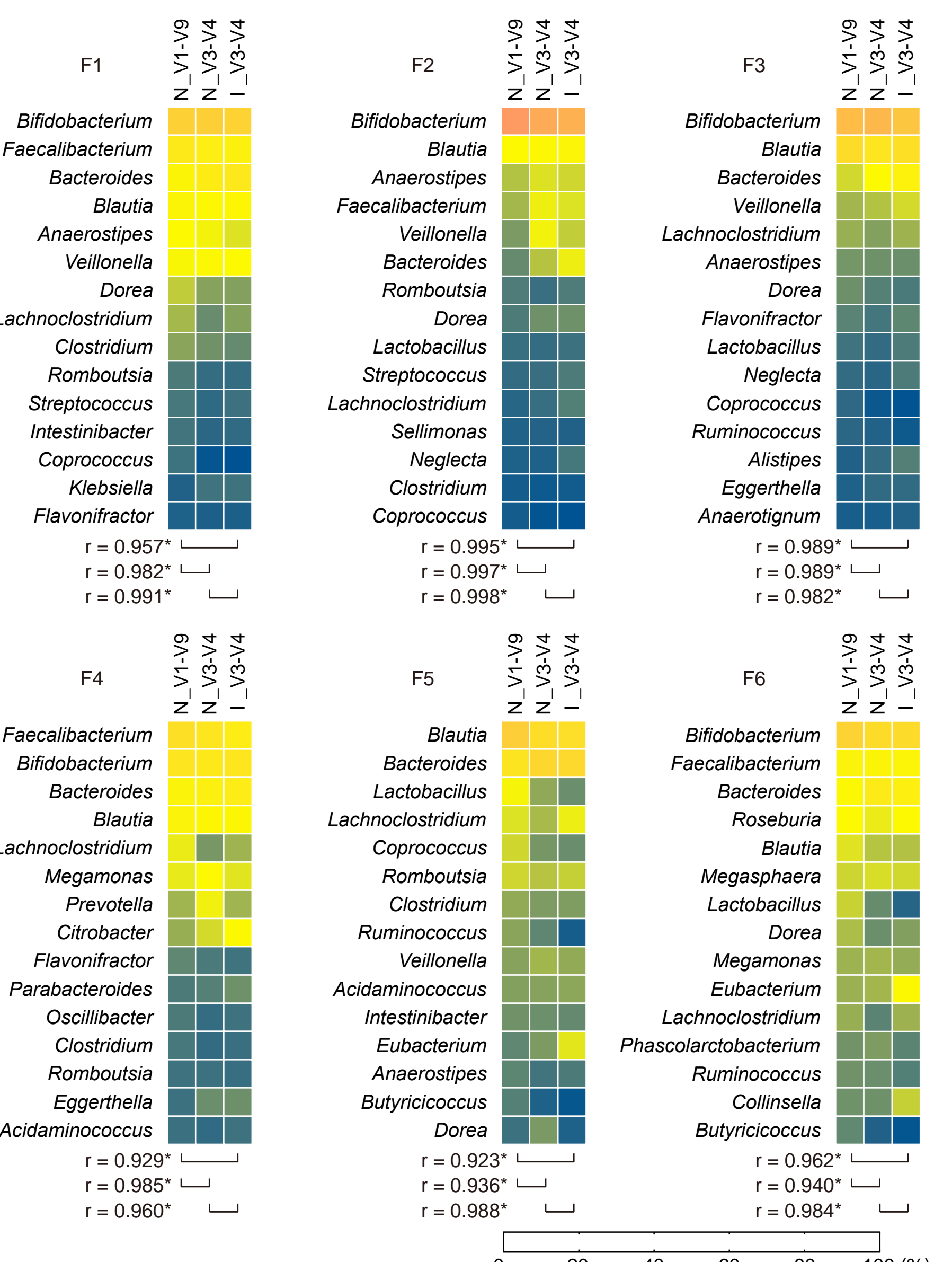
ロングリードによる同定精度の向上 (種レベル)



適用例3-1. 腸内細菌叢解析 (属レベル)

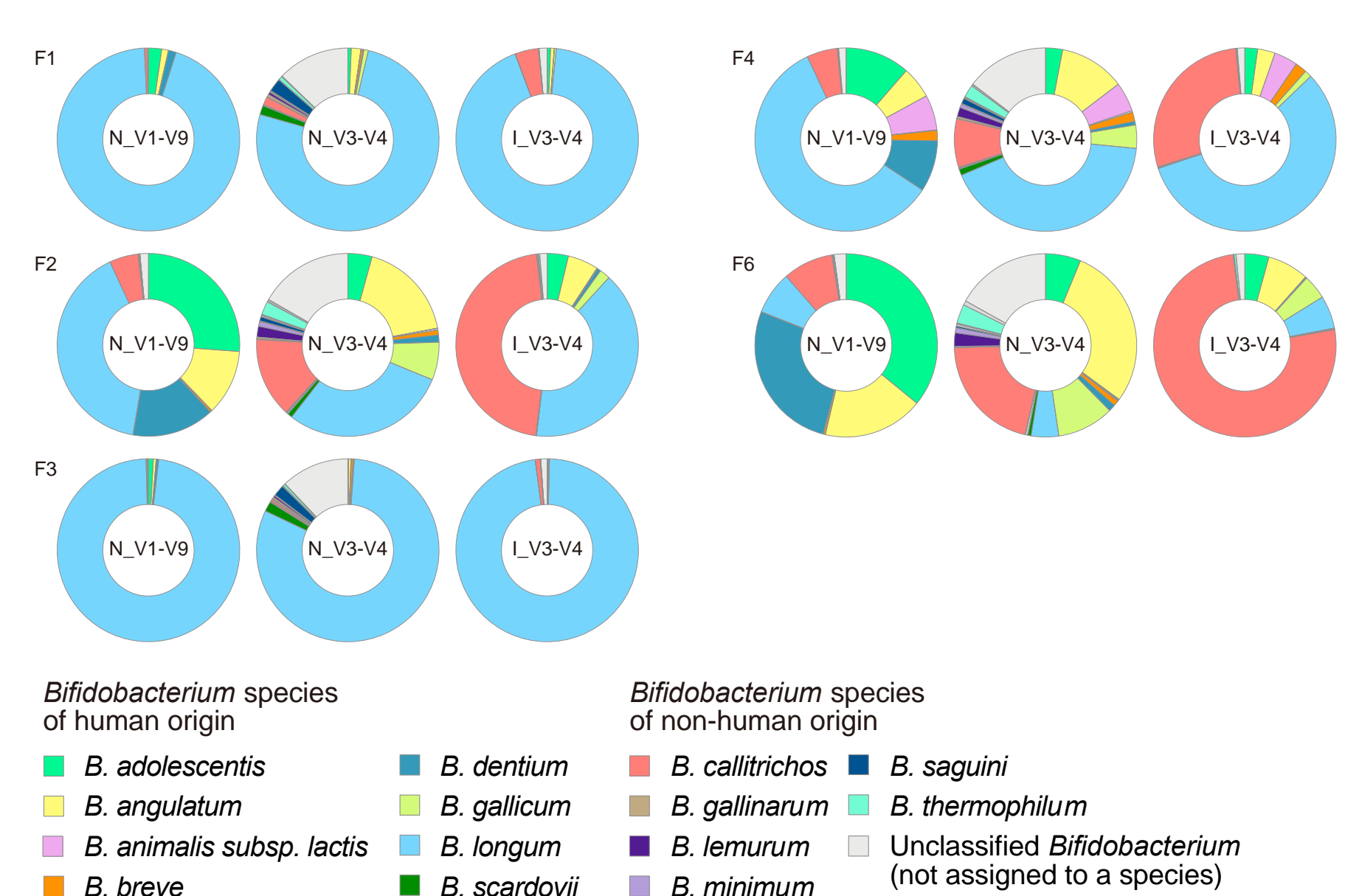
シーケンシングプラットフォームの比較において、MinIONはMiSeqと遜色ない同定精度を示した

ヒト糞便サンプル F1 - F6の16S rRNA遺伝子解析
 N_V1-V9: ロングリード/MinION
 N_V3-V4: ショートリード/MinION
 I_V3-V4: ショートリード/MiSeq



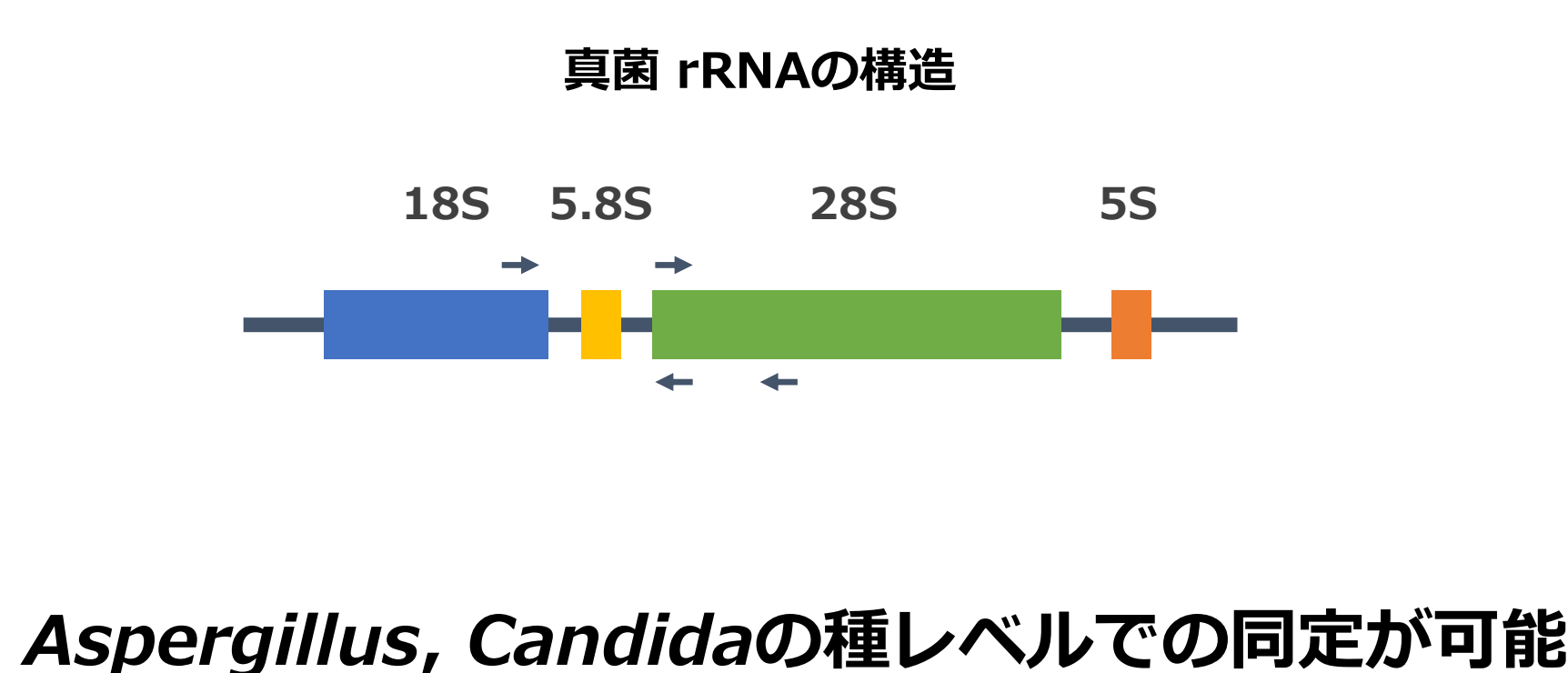
適用例3-2. ビフィズス菌の高解像度分類

ロングリードシーケンシングにより誤同定の低減および種レベルの同定精度向上が認められた



適用例4. 真菌類 (カビ) の同定

リボソームRNA遺伝子解析による真菌同定



Aspergillus, Candidaの種レベルでの同定が可能

