総括研究報告書

１．研究開発課題名：　迅速・正確な感染症診断を可能にする病原微生物同定システムの開発

２．研究開発代表者：　今西　規（東海大学医学部基礎医学系）

３．研究開発の成果

本課題では、ランダムDNAバーコードを用いた定量的16S rRNA解析の技術と、1分子DNAシーケンサによる高速な配列決定技術を確立する。また、薬剤耐性菌の判別も可能な微生物同定のためのゲノム配列解析ソフトを開発する。以上の要素技術を組み合わせることにより、定量性・高速性・汎用性を持つ「病原微生物同定システム」を世界に先駆けて実現し、海外の研究拠点における運用試験を通して、実用化・普及化への道筋を作ることを目標とする。「定量的16S rRNA解析」、「高速ゲノム配列解析」、「クラウド上解析ソフト開発」の３つの研究開発項目を立て、並行して研究を進める。以下に、それぞれの研究開発項目の成果をまとめる。

①定量的16S rRNA解析

・ランダムDNAバーコード法を16S rRNA解析に応用することで、感染症患者由来のサンプルに含まれる病原微生物のDNA数をデジタル定量することをめざし、技術開発に取り組んだ。まず、定量的16S rRNA解析の暫定プロトコルを作成し、その条件検討を行った。16S rRNA遺伝子のV3およびV4領域を対象とするPCRプライマーを設計し、6種細菌DNAの混合物からのPCR増幅とIonPGMを使った配列決定によって、その増幅性能の確認を行った。

・ランダムDNAバーコードはA,C,G,Tがランダムな順序で並ぶ20-merを予定していたが、同一塩基の繰り返しやGC含量の偏りをなくし、さらに二次構造をとることを防ぐための改良を加えた。また、次世代シーケンサから得られる配列データから異なるバーコードを持つ配列のみを集計するソフトウエアを設計し、作成に取りかかった。

②高速ゲノム配列解析

・血液中に含まれる感染菌を効率良く分離するための条件検討を行った。さまざまな条件で分離性能を評価したところ、20Gの遠心分離によって血液中の感染菌を最も効率良く分離できることを明らかにした。

・超小型のポータブル型DNAシーケンサであるOxford Nanopore社のMinIONを用いて、6種微生物DNAを混合した標準サンプルに対し、メタゲノム解析を行った。ライブラリ作成の時間短縮のため、MinIONの標準プロトコルを改良したが、充分な長さと本数の配列データを取得できることを確認した。

③クラウド上解析ソフト開発

・次世代シーケンサを使った感染症サンプルのメタゲノム解析により、感染微生物を正確に判定できるシステムの開発を開始した。本システムは、多数の生物の全ゲノム配列を集めたゲノム配列データベースと、次世代シーケンサから得られる個々の配列に対して由来生物を判定できる微生物判別ソフトウエアで構成される。

・ゲノム配列データベースの開発は、生物の全ゲノム配列を集めた独自のデータベースGenome Syncへの新規データ追加を段階的に実施し、18,000種以上の全ゲノム配列の収集に成功した。微生物判別ソフトについては、PCクラスタ上で動作するソフトウエアGSTKを開発し、実際の配列データを使って動作の検証を行った。微生物の判定にはこれまで、BLASTのbitスコアに基づく単純な判定方式を用いてきたが、16S rRNAのPCR増幅断片の場合には判定に曖昧さが残る場合があることがわかり、方法を改良した。

・インターネットがない環境でもMinIONによる微生物判定ができるように、オフライン版の配列解析ソフトウエアを開発する方針を決めた。Oxford Nanopore社にオフライン版のMinKnowプログラムの使用許諾を得て、ポータブルPC上でテストを行った。また、base callerのソフトウエア調査を行った。

４．　その他