

# ナノポアシーケンサーによる薬剤耐性菌の同定と臨床応用へ向けた基礎検討

鈴木孝昌<sup>1</sup>、尤馨悦<sup>1</sup>、築茂由則<sup>1</sup>、内藤幹彦<sup>1</sup>、西川可穂子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部、<sup>2</sup>中央大学・商学部

## 背景

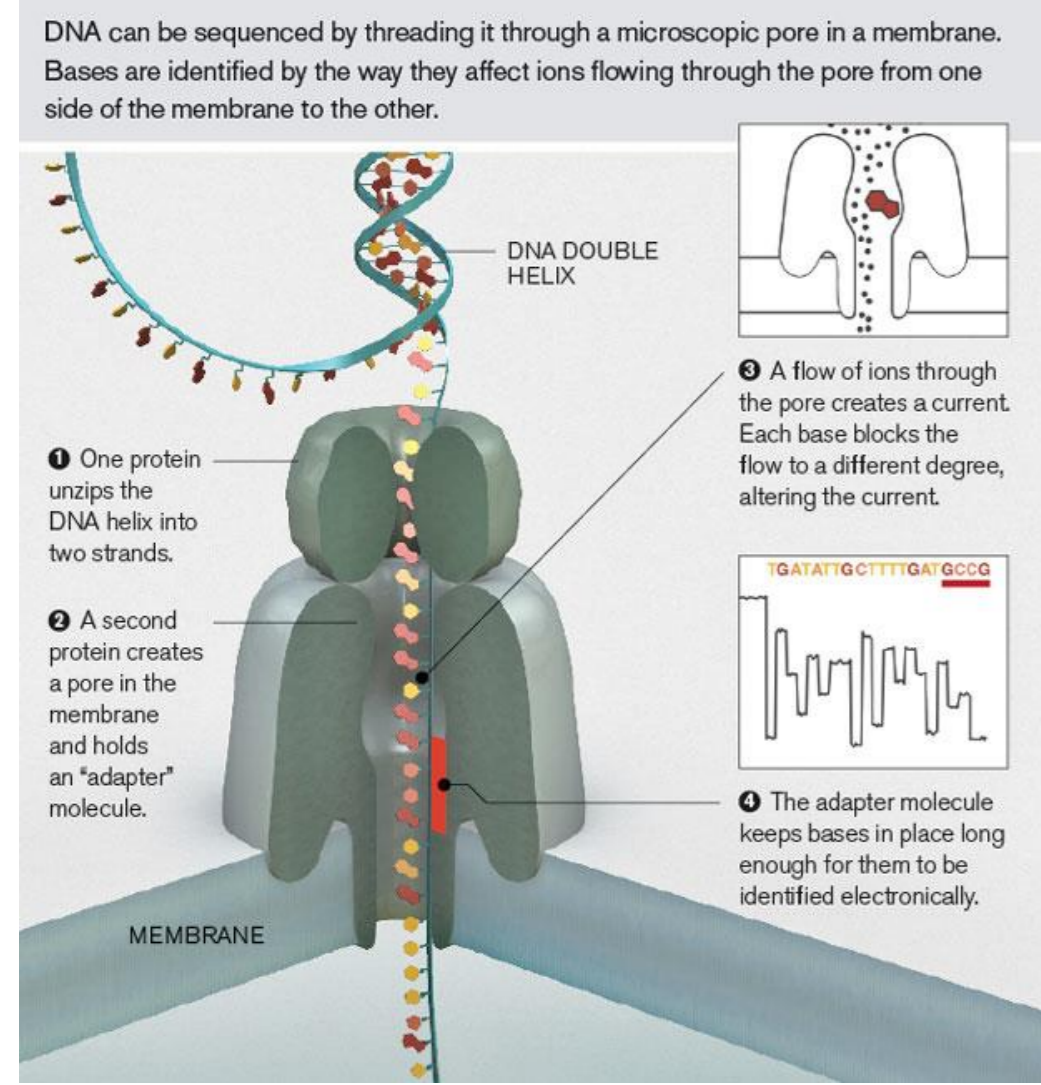
- 薬剤耐性菌の蔓延は世界的な問題となっており、感染症の治療においてもその検出は重要な課題となっている。
- 我々は環境水中の薬剤耐性菌の検出を検討する中で、ナノポア型シーケンサー(MinION)が、簡便迅速な検出系として有効であることを経験し、感染症診断の臨床応用への可能性に注目した。
- 臨床応用に向けた課題とその道筋に関して、規制科学的見地から考察する。

## ナノポア型シーケンサー"MinION"の概要

- ポリマー性の膜に、タンパク質で作られたナノポアが配置され、この膜をはさんで電圧を加えると、ナノポアを通るイオン電流が発生。この中をDNA分子が通過する際の電流の変化を測定することにより、塩基配列を測定できる。
- 蛍光などのラベル化をせずに、直接1分子のDNAを測定可能。
- メチル化を含めた修飾核酸やDNA付加体を電流の変化として検出可能。
- RNA分子も逆転写をせずに直接測定可能であり、修飾RNAも検出可能。
- 読める長さに制限はなく、100Kbを超えるDNAも読めるロングリードシーケンサー。
- 携帯性に優れ、フィールドワークでのシーケンス解析も可能。
- USB接続にてノート型PCにてオペレーション可能。
- 48時間で、10-20Gbのパフォーマンステ、IlluminaではMiSeq程度。
- シーケンスしながらベースコールが可能のため、ランを改正してから数分以内にリアルタイムでデータが得られる。

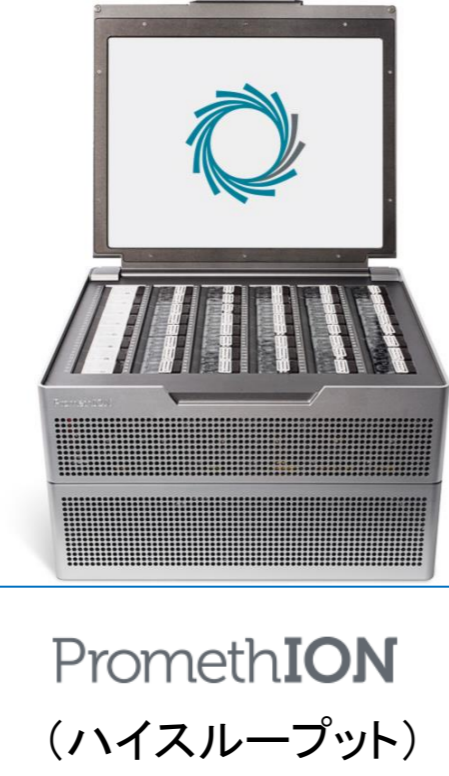


- Choose MinION if you:**
- would like access to sequencing for \$1,000
  - want to sequence immediately, not wait
  - want to sequence outside a lab
  - 10-20Gb per 48 hours

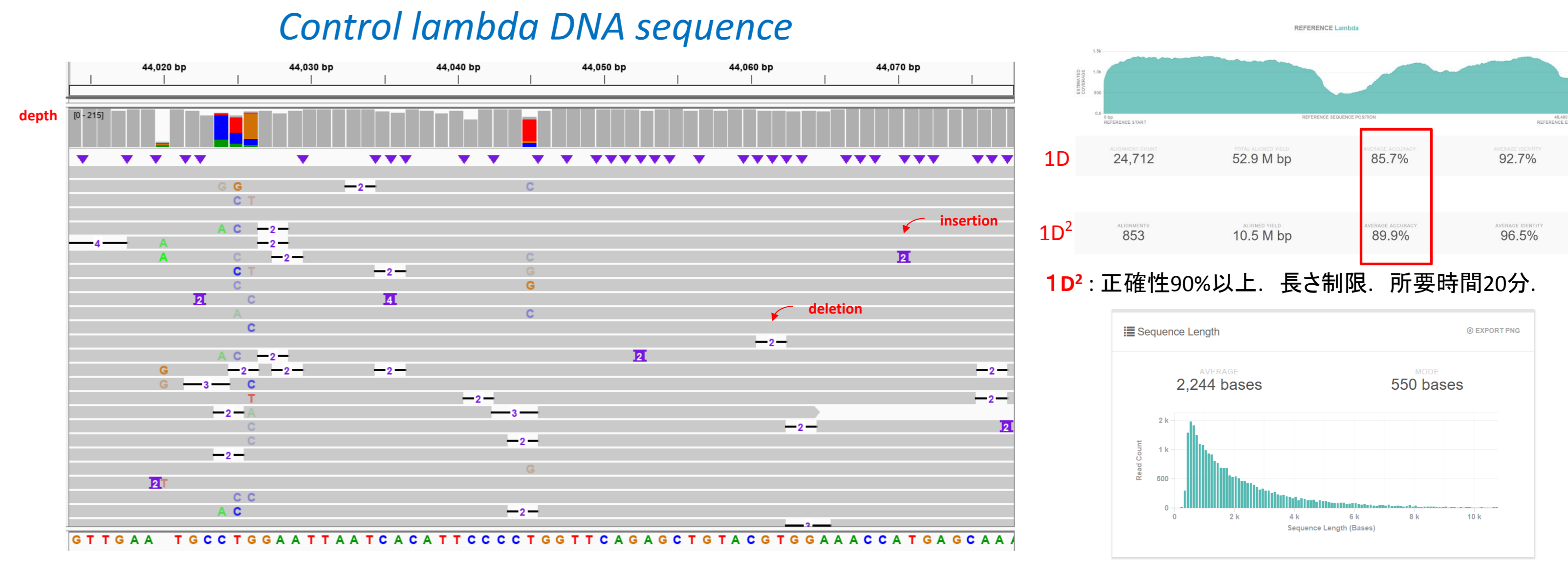


- 2本鎖のうち片側がナノポアを通過する際の電流変化をFAST5ファイルとして保存し、MinknowソフトウェアによりFASTQファイルへと変換される。
- 両方の鎖を読んで精度を上げる1D法も利用可能

(他のラインナップ)



## MinIONのシーケンスエラー率



\* エラー率が高いがコンセンサスを取ればほぼエラーなし。感染菌の同定には十分な正確性

## 16SrRNA法とMinIONによる同定結果の比較

一晚培養した菌よりDNAをGenra PurGene Kit (QIAGEN)にて抽出し、Nanopore Rapid Barcoding Kitを用いてライブラリー調製後、6検体を混合してMinIONでシーケンス。

Barcode	Sampler	AMR	16SrRNA同定結果	MinION Top Hit	Reads	AMR genes
BC01	29	SAM20	<i>Esiglobacterium indicum</i> strain HHS 31	<i>Esiglobacterium</i> sp. MH3	104/162	None
BC02	27	SAM20, CLR15	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469	<i>Escherichia coli</i>	1140/2182	efflux pump >50, polymyxin resistance >7, etc.
BC03	31	TE30, SAM20	<i>Chryseobacterium tractae</i> strain 1084-08	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	90/185	CGB-1 beta-lactamase
BC04	47	LVX5	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94/374	16S rRNA (rrsB) mutation 4
BC05	51	LVX5	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Bacillus cereus</i>	345/683	16S rRNA (rrsB) mutation 10, EF-Tu mutant, rpoB mutant
BC06	60	SAM20, CLR15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Bacillus thuringiensis</i>	420/1517	16S rRNA (rrsB) mutation 21, class B (metallo-) beta-lactamase 1, EF-Tu mutant 1, rpoB mutant 1

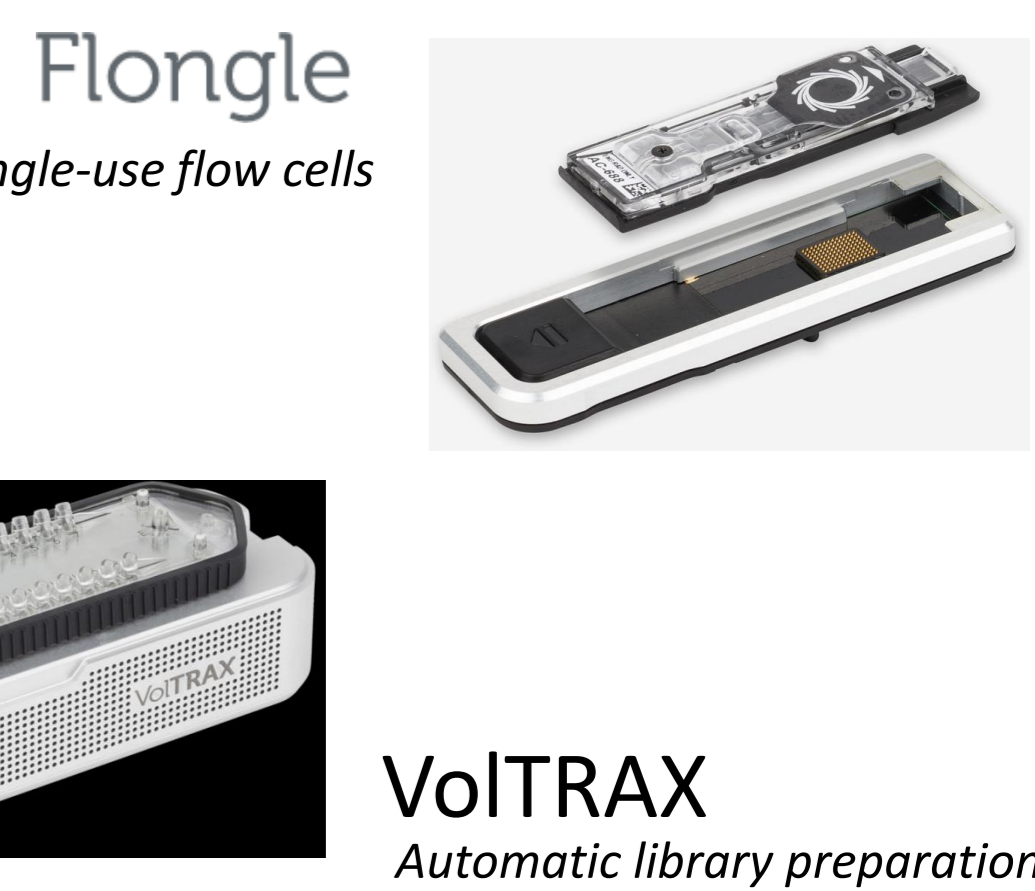
\* Genus(属)レベルではすべて一致。薬剤耐性遺伝子に関しては、さらに検討が必要。

## MinIONを使ってみてわかったこと

- 超ロングリードが可能(>100Kb)
- サンプル調製が非常に簡単(<30分)
- シーケンサー本体は実質タダ(スターターキット \$1000)
- どこでもシーケンス可能
- シーケンスしながらすぐに結果がわかる
- フローセルを洗浄して再利用可能
- メーカーのサポートない(Nanoporeコミュニティが頼り)
- セットアップが大変
- エラー率が高い(15%程度)

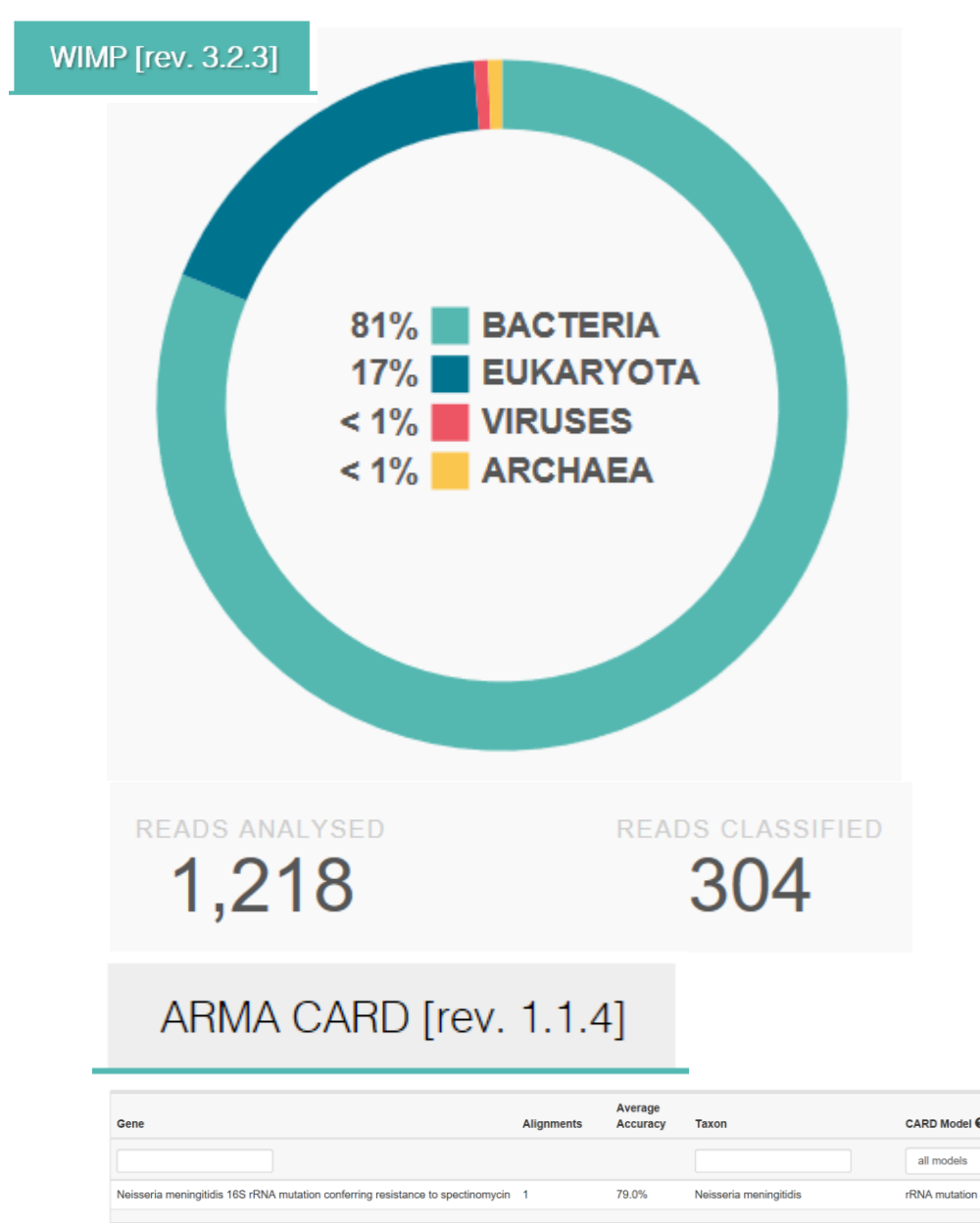
## 臨床応用への課題

1. 正確性、頑強性の向上。
2. 臨床検体からの病原体DNA回収
3. 薬剤耐性遺伝子DBと検索法の確立
4. コストダウン
5. 自動化
6. 国産化



## 環境水中からの薬剤耐性菌の分離

### MinIONによる河川水のメタゲノム解析例



Taxon	Cumulative Reads
Microcystis	20
Acidovorax	10
Pseudomonas	9
Homo	9
Limnobabta	8
Flavobacterium	7
Burkholderia	7
Ramlibacter	6
Rhodobacter	4
Rhodospirax	4
Methylobacterium	3
Porphyrobacter	3

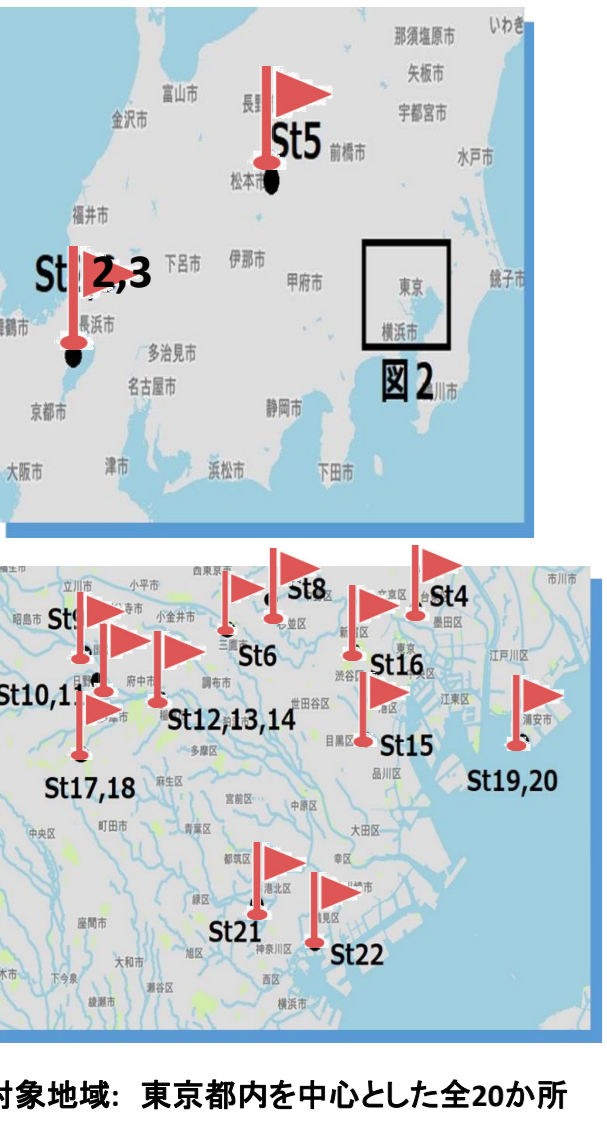
### ヒットした菌種の例(スコアの高いもの)

name	score
<i>Leclanotia lanzarotensis</i>	1017457
<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 2860	27010
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	20647
<i>Orygia pseudotsugata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	19881
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	16687
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	15736
<i>Gryllus bimaculatus</i> nudivirus	14400
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	13225
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	11526
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806SL	10686
<i>Candidatus</i> Planktophila vernalis	10441
<i>Comamonadaceae</i> bacterium B1	8681
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	7414
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7208
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	6826
<i>Aeromonas aquatica</i>	6320
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	5205

河川水を濾過して得られた菌体よりDNAを抽出し、MinIONにて直接シーケンス解析。薬剤耐性遺伝子に関しても、同時に検出可能

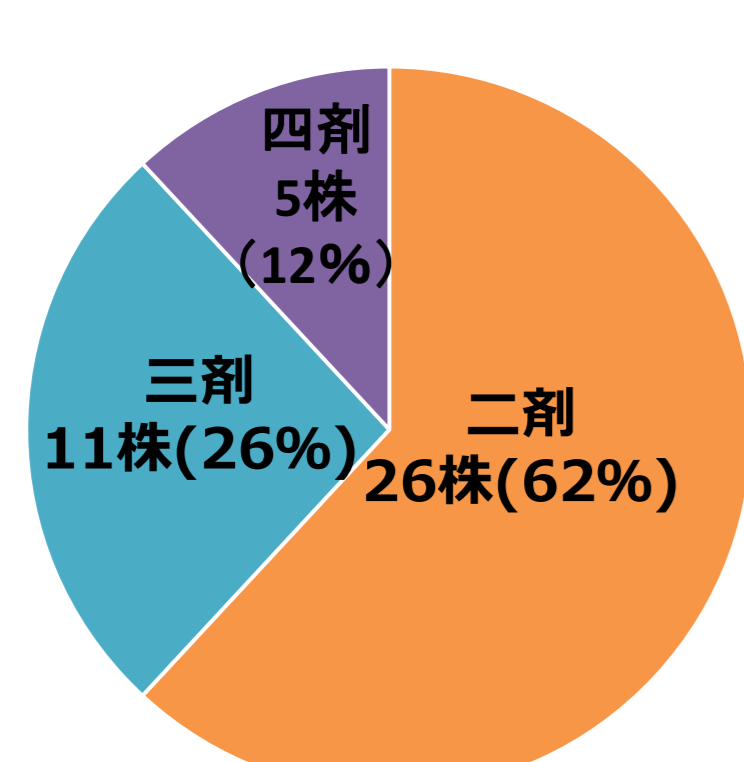
培養可能な菌を分離し、薬剤耐性を調べる

### 全地点でAMR検出



### 複数薬剤耐性

薬剤耐性数別の割合

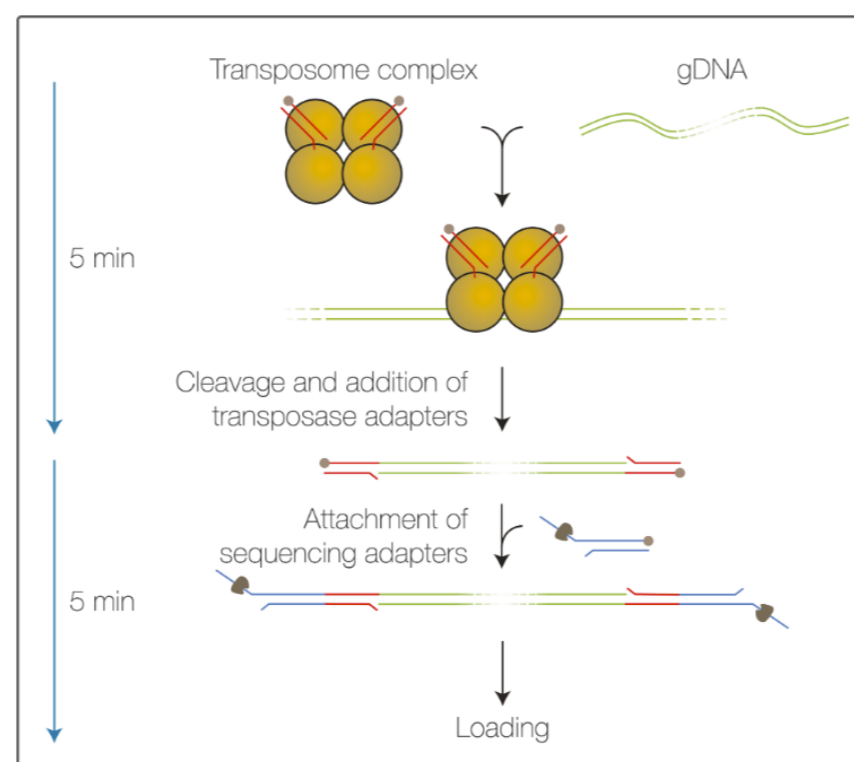


### 16SrRNAシーケンス(サンガー法)による同定例

Sample No.	Sampling Station	Sequence alignment	Identity	備考
33	12	SAM20, CLR15	<i>Rhodobacterium rubrum</i> strain HHS 31	100% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
26	33	SAM20	<i>Esiglobacterium indicum</i> strain HHS 31	99% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
31	34	TE30, SAM20	<i>Chryseobacterium indologenes</i> strain HHS 31	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
32	14	SAM20	<i>Achromobacter junii</i> strain ATCC 17908	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
38	10	CLR15	<i>Hafnia paralvei</i> strain ATCC 29927	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
44	8	SAM20, CLR15	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain KCTC 2190	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
45	8	TE30, SAM20, AN30	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain DSM 898	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
51	16	SAM20, AN30	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。
57	17	SAM20, CLR15	<i>Pseudomonas phoenicis</i> strain NBRP 10052	98% 同定可能。同定結果は、同定結果と一致。

## ライブラリー調製(Rapid Sequencing kit)とラン

1. 抽出した検体DNA400ng(7.5μl)にFragmentation mix(2.5μl)を加える。
2. 30°C1分、80°C1分インキュベート。
3. Rapid Adaptor (1μl)を加え、室温で5分放置。
4. フローセルのpriming portへpriming mix (800μl)を加え5分放置。
5. フローセルのsample portを開け、priming mix (200μl)を加える。
6. 調製したlibrary(11μl)にSequencing Buffer (34 μl)、Loading Beads (25.5 μl)、水 (4.5 μl)を加え、フローセルのsample portへ滴下。
7. sample portとpriming portを閉じ、PCIに接続してシーケンスランを開始する。



## 薬剤耐性遺伝子の検出と菌の同定

The EPI2ME platform is a cloud-based data analysis service

**WIMP (What's In My Pot) methods:** The WIMP application is optimized for Oxford Nanopore Technologies DNA sequence reads. WIMP classifies DNA sequence reads against WIMP database which is prepared from RefSeq and provide taxonomic classifications.

**ARMA (Anti-microbial Resistance Mapping App) alignment:** The ARMA performs a minimap2 DNA sequence alignment against references sequences downloaded from the CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) reference database, and annotated from the corresponding CARD ontology.

Oxford Nanopore社により、薬剤耐性遺伝子検出用のワークフローが提供されており、EPI2MEというクラウドベースの解析が可能。(現在は無償だが、将来的に課金される可能性あり)菌の同定に関しても、WIMPの機能を使って同時に行われる。

## 臨床応用が期待できる分野

- 感染菌(薬剤耐性)の診断
- がん転座融合遺伝子の検出
- 染色体(ゲノム)構造異常の検出
- メチル化(エピゲノム)解析
- トリプレットリピート病の診断
- Direct RNA シーケンス

## POCTシーケンサーとして診断応用の可能性

診察中に結果が出て治療に反映

- 感染菌の特定
- 薬剤耐性のチェック
- SNP判定
- 薬剤感受性のチェック
- 投薬量の決定
- 血液型(HLA)の判定
- 薬の効果の予測



## COI

発表内容に関連し、開示すべきCOIはありません。