

氏名	大内 勇樹
所属	バイオリソース部門
学年	D2
出張先	フロリダ大学 Emerging Pathogens Institute (EPI)
出張期間	9 日間
目的	類鼻疽菌における鑑別法・遺伝子型別法の評価ならびに新たな薬剤耐性化機構に関する研究

活動内容 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

類鼻疽は、グラム陰性桿菌である類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) によって汚染された土壌の粉塵や水の飛沫の吸引または傷口との接触により引き起こされる人獣共通感染症であり、東南アジア、南アジア、オーストラリア北部、中南米等での発生が報告されている。潜伏期は数日から数年と幅が広いが、亜急性または慢性の症例では、結核に類似した呼吸器症状を示し、X 線検査において上葉性の空洞形成を示すため、結核と誤診されることがある。また、結核の治療で処方される薬剤は基本的に類鼻疽に有効ではない。効果的な治療を行うためにも、安価で容易、迅速な鑑別診断法がそれぞれの病原菌に対して必要とされている。

演習先である EPI では、結核および類鼻疽の疫学調査およびワクチン開発が行われている。また、申請者の所属研究室は、結核の疫学研究を行っており、結核菌の早期同定や菌株間の分子疫学的解析を目的としたツールを開発している。所属研究室において、類鼻疽菌を検出するために開発された Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法 (Bp-LAMP) の有用性を確かめることを目的とし、EPI において臨床分離された類鼻疽菌株より抽出された DNA を利用することとした。この LAMP 法は、検査コストも安く、複雑な機械や手法を必要としないため、PCR 等の核酸増幅法を行える設備の無い途上国や地方の診療所でも実施可能であると考えられる。また、既に類鼻疽菌として同定された菌株については、次世代シーケンサーを利用した一遺伝子多型 (SNP) 解析により、菌株の詳細な遺伝子型別・薬剤耐性変異検索を行い、伝播経路および流行株を特定し、新たな感染の予防策に応用することとした。また、次世代シーケンサーより得られた類鼻疽菌のゲノムデータから、新規の薬剤耐性化機構に関わると考えられる遺伝子情報を探索した。

以下に報告者が担当した、出張行程を含む共同研究のスケジュールを挙げる。

(2017)

*11/13～16：次世代シーケンサーによる類鼻疽菌の SNP 解析

*11/17～22：Bp-LAMP の予備実験

(2018)

*2/11～16：セフトジジム耐性変異を検出する Multiplex PCR 法の開発・検討

2/17：移動日（新千歳空港～成田空港～アトランタ空港～ゲーンズヴィル空港）

2/18：予備日

2/19～20：Bp-LAMP の有用性評価および検討

2/21～22：類鼻疽菌の全ゲノム解析から得られたデータの解析および考察

2/23：セミナーにおける研究紹介

2/24～25：移動日（ゲーンズヴィル空港～アトランタ空港～成田空港～新千歳空港）

*2/27～：Bp-LAMP の追加実験、セフトジジム耐性変異検出法に関する実験

（* 所属研究室において行われた予備実験および追加実験）



図 1. EPI の外観

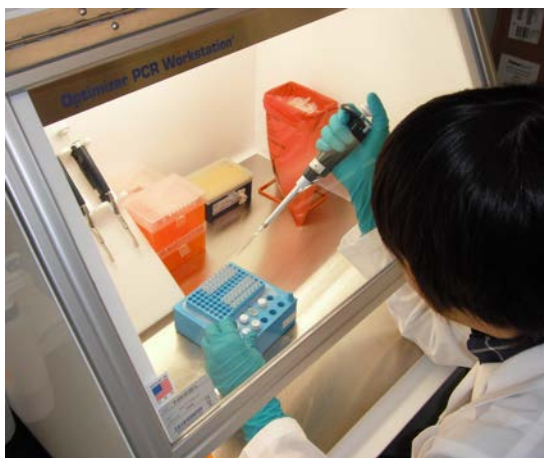


図 2. EPI での実験作業の様子



図 3. EPI でのディスカッションの様子

60 株の類鼻疽菌より抽出された DNA を用いた Bp-LAMP の結果、全ての株において陽性の反応が得られた。これにより、Bp-LAMP 法の類鼻疽菌検出法としての高い有用性が評価された。現在、追加実験として、結核菌株および類似の呼吸器感染症を引き起こす要鑑別菌株 (*B. thailandensis*, *B. oklahomensis*, *B. vietnamiensis*, *Acinetobacter baumannii* など) より抽出された DNA を用いて、Bp-LAMP の特異性評価を行っている。また、次世代シーケンサーを用いた SNP 解析の結果、類鼻疽の数少ない治療薬であるセフトジジムに対して耐性を与える変異が、類鼻疽菌株のクラス A- β -ラクタマーゼ遺伝子 (*penA*) において維持されていることが分かった。新規の研究として、セフトジジム耐性変異を検出する Multiplex PCR 法および核酸クロマトグラフィーの開発を報告者の所属研究室が担当することとなり、実験を進めている。加えて、*penA* に変異を持つ類鼻疽菌株の中でも、薬剤感受性試験の結果からセフトジジム耐性の度合いに差が有ることに着目し、次世代シーケンサーより得られたゲノムデータを解析した。ゲノムアセンブリの結果、セフトジジムに対して強い耐性を示す菌株 (Strain12 など) において、リファレンス配列に対してマップされたリード数を調べると、*penA* を含むゲノム領域に厚み (depth) があることが分かった (図 4)。これにより、この領域に繰り返し配列があることが示唆された。変異を持つ *penA* をゲノム内に多く所持することで、高度耐性化を獲得するという新しい薬剤耐性機構が予測された。ディスカッションの末、EPI では定量 RT-PCR による *penA* のコピー数の測定、所属研究室では PacBio による繰り返し配列の完全解読を行うこととなった。

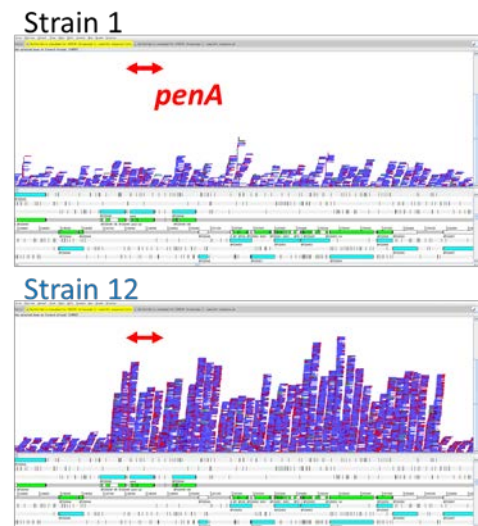


図 4. ゲノムアセンブリの結果

所属研究室および出張先の EPI において行われた実験ならびにその結果に関するディスカッションは、今後も共同研究を行っていく上で大変有意義なものであった。特に類鼻疽菌の疫学情報および薬剤耐性化機構については、結核菌とは異なる点が多々あり、報告者にとっては新しい分野であった。今回の共同研究演習において、実際に海外の共同研究者と話し合うことで、他分野の知識・技術を相互の研究にどのように共有・応用するべきか、さらに、その成果をどのように実用化するのがよいかなど、新しい考えを取り入れるのに大変よい経験を積むことができた。また、最終日には、EPI のポスドク・大学院生と互いの研究を紹介しあう機会があり、海外の若手研究者たちの最前線の研究内容や熱心な研究態度を直に知ることができ、自身にとっても良い刺激となった。短い滞在ではあったが、今後の共同研究だけでなく自身のキャリアパスを考える上でも実りある出張であった。

(海外共同研究演習) 指導教員評

指導教員所属・職・氏名	人獣共通感染症リサーチセンター・バイオリソー 印 ス部門・鈴木 定彦
実施内容について講評を記述して下さい 短期間であったが、類鼻疽菌検出のための LAMP 法の性能評価、次世代シーケンサーを用いた類鼻疽菌の SNP 解析、類鼻疽菌のセフトジジム耐性変異の解析と多岐にわたる共同研究を実施して、良好な成果を得ている。更に、共同研究相手先の教員、博士研究員ならびに大学院学生との交流を通じて米国の研究室の雰囲気を知ることができ、非常に有意義な海外共同研究演習になったものとする。	

※1 本報告書はリーディングプログラム運営委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG で UPLOAD

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp