

## 総説

# 非結核性抗酸菌の迅速その場同定 —臨床現場での微生物ゲノム解析の現状と今後の展望—

中村昇太, 松本悠希, 福島清春, 飯田哲也\*

大阪大学微生物病研究所感染症メタゲノム研究分野 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1

Key words: non-tuberculous mycobacteria, genomics, next-generation sequencing, cloud computing

### はじめに

非結核性抗酸菌 (non-tuberculous mycobacteria: NTM) は結核菌群 7 種, らい菌 1 種 (*Mycobacterium leprae*) を除く, 200 種を超える多様性をもつマイコバクテリウム属菌の総称である (Gupta *et al.*, 2018; Ohkusu, 2021). NTM は土壌や河川, 海洋など環境中に広く存在し, その一部はヒトだけでなく, 鳥や豚などさまざまな動物にも病原性を示す. 分類上はグラム陽性菌であるがグラム染色では容易に染色されず, チールネルゼン法により赤い多形性の桿菌として染まる. その増殖性により迅速発育菌と遅発育菌の 2 つに大別され, ヒトに病気を起こす迅速発育性の NTM は *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* の 3 種のみで, 結核菌やらい菌と同様, ヒトへの病原性を示す多くの NTM は遅発育菌である. NTM が引き起こす病気の大部分は呼吸器疾患である肺非結核性抗酸菌症 (肺 NTM 症) であり, まれにリンパ節炎や皮膚疾患を引き起こす場合もある. 日本における肺 NTM 症の原因菌種は *M. avium* と *M. intracellulare* を合わせた *M. avium* complex (MAC) が 83% と多くを占め, 次に *M. kansasii* (8%), *M. goodii* (2%), *M. abscessus* (2%) が続く (Namkoong *et al.*, 2016). 結核と異なり, 肺 NTM 症のヒト-ヒト感染は起こらないといわれており, 土壌や汚染水からの曝露が感染リスク要因と考えられている. 感染後は自覚症状がほとんどないまま長い時間を掛けて病状が進行し, 発症後は咳・痰・血痰・発熱・食欲不振・体重減少・全身倦怠感などが見られ, 抗生物質も効きづらいために長期の

薬剤治療が必要となる難治性の疾患である. 高齢化との関連が示唆されており, 日本では 2002 年の調査で人口 10 万人当たり 3.7 とされていた罹患率は, 2014 年の調査では 14.7 と増加しており (Namkoong *et al.*, 2016), 米国 4.7 (2015) や英国 2.9 (2006) と比較して世界的にも日本が高い罹患率であることが明らかになっている. 肺 NTM 症の検査では PCR や DNA-DNA ハイブリダイゼーション法, MALDI-TOF 質量分析法による同定法などがあるが, 遅発育性のために培養に時間が掛かり, さらに 200 種を超える多様性を網羅する検査手法が存在しないことが課題とされてきた.

### コアゲノム MLST による NTM の菌種同定

多様な NTM のなかには *M. abscessus* のようにさらに 3 種の亜種 subspecies *abscessus*, *massiliense*, *bolletii* に分類が分かれ, それぞれ薬剤感受性が異なることが知られているものもある (Johansen *et al.*, 2020). こうした多様な NTM の菌種や亜種の正確な同定を行うためには, 従来の数遺伝子の情報を基にした multi-locus sequence typing (MLST) 法では不十分と考え, さらに比較するハウスキーピング遺伝子を増加させたコアゲノム MLST (cgMLST) 法による同定法を検討した (Matsumoto *et al.*, 2019). NTM 間に高度に保存するハウスキーピング遺伝子を検討するためにはゲノムデータベースの網羅性が重要になる. 既存の pubmlst データベース (<https://pubmlst.org/>) を調査したところ NTM に関しては 32 種の情報しか登録されておらず, ゲノムデータの拡張が必要であった. そこでわれわれはゲノム情報が不十分であった 63 種の NTM を理化学研究所バイオリソース研究センターか

\*Corresponding author

E-mail: iida@biken.osaka-u.ac.jp

ら提供を受け、それらのゲノム解析を実施した。また公共データベースからNTMのドラフトゲノム情報の収集も行い、決定したゲノムと合わせて7,547のゲノムプロファイルデータを得た。その結果、NTMに関しては175種、抗酸菌としては186種を網羅するゲノムデータベースを構築した。この175種のゲノム配列からコアゲノムを作成し、MAFFTおよびFastTreeにより系統樹を作成した結果、数種の例外はあるが迅速発育菌と遅発育菌のNTMに分かれる系統関係を確認した(図1)。

cgMLST解析には全ゲノム情報のなかから同定に有効な遺伝子セットを定義する必要がある。このために得られたゲノムデータからNTM間に共通して存在するハウスキープ遺伝子や病原性に関与する遺伝子等を選別し、184遺伝子を対象としたcgMLST用データベースを構築した。さらに、このデータベースにシーケンズデータを参照し、菌種の同定結果を出力するソフトウェア“mlstverse”を開発した。正確な菌種同定には、データベース中の同定対象に対する一致度が高くなること(感度が高い)と、同定対象以外に対する一致度が低く抑えられる(特異度が高い)必要がある。175種のNTMについて、これら特異度を検討した結果、属レベルの解像度にとどまる16S rRNA遺伝子を用いた場合と比較して、種レベルで特異的に区別できていた(図2A)。またそのうち、臨床的な鑑別が重要となる*Mycobacterium abscessus*の亜種間での特異度を評価したところ、亜種レベルにおいても高い特異度を有することを確認した(図2B)。

この手法論の評価のために、すでにMALDI-TOF MS法(Vitek MS v3.0 system)によって菌種が判明している13株について、cgMLSTによる再解析を行った。その結果、13株中12株が質量分析と一致し、不一致の1株に関しては質量分析では*M. intracellulare*であったが、われわれの手法では*M. yongonense*という同定結果であった。この株の全ゲノム情報を用いて近縁系統の確認を行ったところ、*M. yongonense*が正しい同定結果であると結論づけた。また13株のなかには、質量分析では菌種名までの同定結果であったが、われわれの手法により*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. avium* subsp. *hominis-suis*などの亜種が判明した。これら13株は既知例の再解析であったが、次に質量分析では同定不明となっていた16株を用いて解析を行った。その結果、16株すべての菌種が判明し、それらは*M. gordonae*, *M.*

*lentiflavum*, *M. wolinskyi*, *M. kansasii*, *M. colombiense*, *M. europaeum*といった稀少なNTMであった。こうした稀少なNTMは質量分析のデータベースに登録が少なく、ゲノム情報も乏しいことから見逃されてきた可能性がある。今後もこうした稀少なNTMのゲノム情報を収集することによって、これまでの統計にはない隠れた肺NTM症の実態を明らかにできるかもしれない。

### ナノポアシーケンシングとクラウドコンピューティングによる迅速その場同定

初の次世代シーケンズ技術は2005年頃から登場し、2014年頃に登場したナノポアシーケンズ技術であるOxford Nanopore Technologies社のMinIONによって、小型のゲノム解析デバイスを携帯することが可能となり、場所を選ばずロングリードによるゲノム解析が可能となった(Clark *et al.*, 2009)。次世代シーケンズ技術の登場から約20年、ナノポアシーケンズ技術の登場からは早10年が経つが、場所を選ばないはずのMinIONが、日常的に病院等で活用されている状況にはいまだいたっていない。その主な要因としてはデータ解析の困難さにある。MinIONから出力される生データは1時間当たり約20GBに達し、1分当たりの換算でおよそ330MB/minとなるが、これは4K動画(350MB/min)の情報量に匹敵するだけのデータを、ネットワークを介したうえで高次解析処理し続ける必要があることを意味する。個々の病院などのそれぞれの拠点において計算機環境やそれを扱う人材を確保し、これだけのデータ量に対して、リアルタイムに遺伝情報を解析することはきわめて困難であると予想される。そこでわれわれはシーケンズ作業と解析作業を分け、シーケンズ作業はできるだけ臨床現場に近い場所で実施し、得られたゲノムデータはリモートで大型計算機に自動で送信し解析後、臨床現場に結果を即時に返すようなクラウドコンピューティングを活用したシステム開発を行った。Webで運用されている解析システムは多くあるが、データをアップロードしてから解析するのではなく、あくまでもナノポアシーケンズ実験を実施する一連の流れから自動化し、ユーザーが解析過程を意識することなく自然に結果を閲覧できるようなシステムを目指した。開発した“mlstverse-web”システムの実地試験を行った結果、ナノポアシーケンズを実施後、早い場合には約30分以内には結果として種名とMLSTスコアのリストとして閲覧できることを確認した。

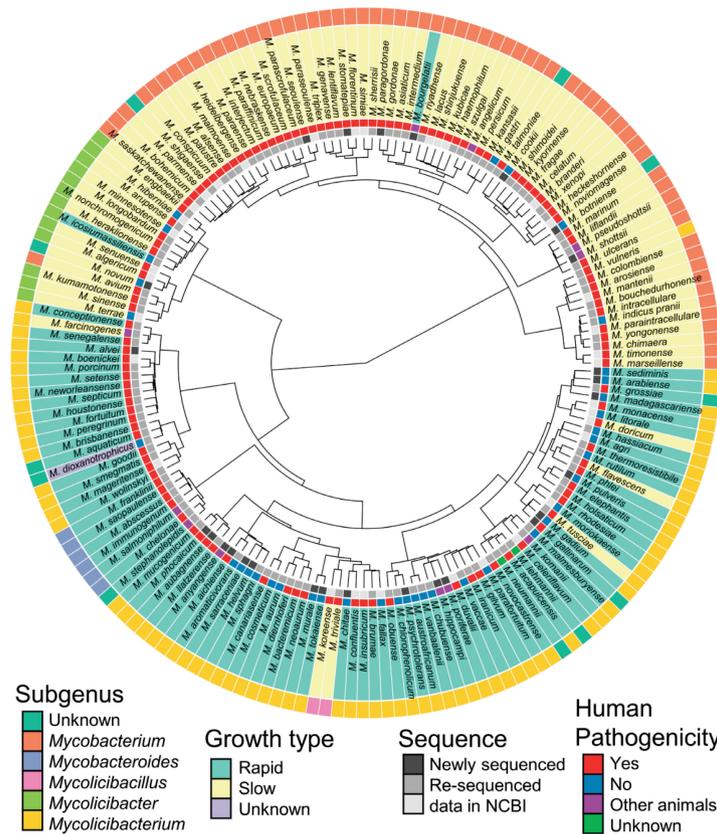


図1 NTM 175種の系統樹

環状に示された分類は外側から5つの亜属分類 (Gupta *et al.*, 2018 に基づく), 増殖タイプの迅速発育菌 (Rapid: 緑) および遅発育菌 (Slow: 黄) の分類, 3つのアセンブリ配列の由来 (新規決定: 濃灰色, 再解析: 灰色, 公開データ: 淡灰色), ヒトや家畜に対する病原性 (病原性有: 赤, 病原性無: 青, 動物への病原性: 紫, 不明: 緑) についてそれぞれ色別に示す。

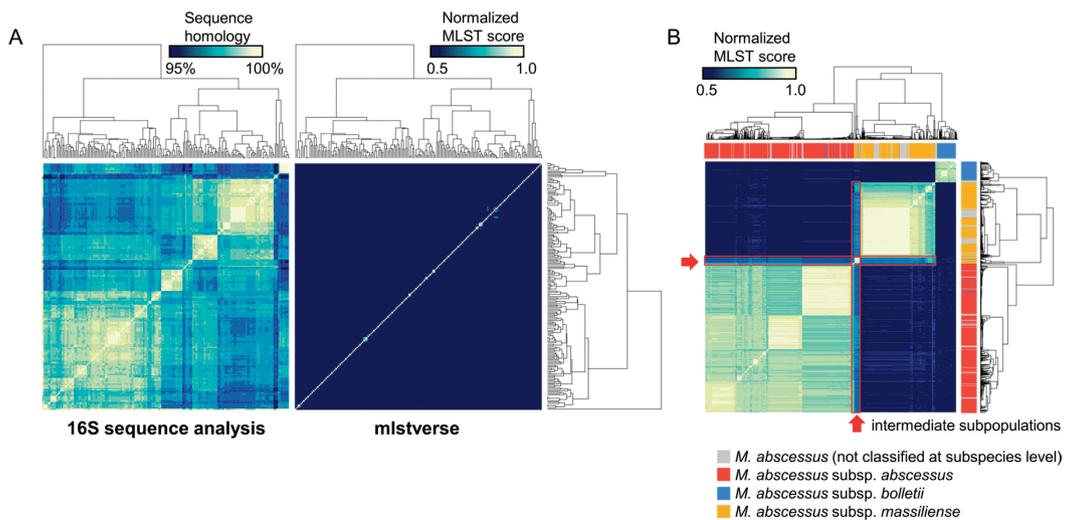


図2 MLSTにおける特異度の評価

A: 種レベルでの特異度. 16S rRNA 遺伝子の相同性 (左) および mlstverse データベース上の 184 遺伝子を用いた場合 (右) の評価. 16S rRNA 遺伝子では高い相同性を共有する種が多く, それに比べ 184 遺伝子を用いた場合には 1 対 1 のみの高い相同性スコアとなる. B: *M. abscessus* 亜種同士のプロファイル類似性の評価. 3種の亜種間でのみ高い相同性スコアが共有されており, 他の亜種に対しては低いスコアが維持され, 亜種特異性が高いことが示されている。

### 国内外医療機関でのフィージビリティ研究

このクラウドによる同定システムを使用する臨床現場としては病院等の検査室が想定されたため、菌体からのDNA抽出やライブラリ調製過程もできるだけ簡便化を行った。必要な器具装置類はすべて持ち運べるサイズのものを選択し、ノートPCと持ち運び実験器具セットを医療機関に持ち込めば実験を実施できるように工夫を行った(図3)。この同定セットを国内外の協力医療機関に導入し、NTM同定のフィージビリティ研究を継続している(図4)。各医療機関によってネットワークの問題やライブラリ調製の失敗等、さまざまな課題に直面したが、システムやプロトコルをアップデートし解決してきた。現在では国内9機関、海外1機関にこのシステムを使用していただきながら、さらなる改良を続けている。このような取り組み

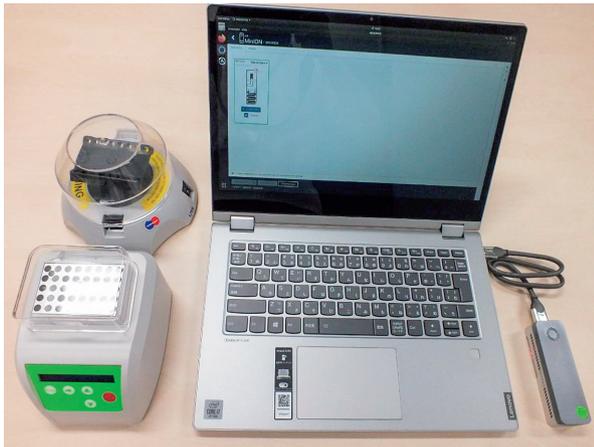


図3 持ち運び実験器具セット

写真右より MinION シーケンサー, ラップトップ PC, 卓上遠心機, ブロックヒーターが含まれる。



図4 トレーニングの様子

のなかで、稀少な肺 NTM 症例の菌種同定にこのシステムが役立ち、新種の発見につながった例があったので最後に紹介する。

#### 1) *Mycolicibacterium toneyamachuris* の症例 (Kuge *et al.*, 2020)

特に既往のない44歳の女性が慢性的な気道症状の繰り返し悪化のため刀根山医療センターに紹介受診となった。胸部CTでは中葉、両下葉に小葉中心性分布の小結節影および気管支拡張が見られ、肺NTM症に合致するCT所見を呈した。エリスロマイシンによる内服加療を行うも症状は悪化し、喀痰より同定不能迅速発育菌が繰り返し分離されたため、同定不能菌による肺NTM症と診断した。その後の全ゲノム解析により、同定不能菌は *Mycolicibacterium mucogenicum* に遺伝的に近い新種であることが判明し、病院名から *Mycolicibacterium toneyamachuris* と種名を提案した。薬剤感受性試験の結果を参考に、クラリスロマイシン、モキシフロキサシン、アミカシン、イミペネム/シラスタチンの併用療法を開始し、症状および画像所見は改善した。

#### 2) *Mycobacterium senriense* の症例 (Abe *et al.*, 2022)

慢性閉塞性肺疾患のある74歳の男性が、数日前からの発熱と呼吸困難のため受診した。慢性呼吸器症状の悪化を繰り返し、何度も入院を要した既往があった。胸部CTでは、両側肺気腫が著明で、左上葉に浸潤影、左下葉に軽度の気管支拡張を認めた。一般細菌培養は陰性であったが、小川培地による抗酸菌検査にて同定不能菌が分離された。16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、この菌株は *Mycobacterium avium* complex に属する種およびそれらの近縁種に類似していることが示された。全ゲノム解析により、同定不能菌は *Mycobacterium vulneris* に遺伝的に近い新種であることが判明し、地名の千里から *Mycobacterium senriense* と種名を提案した。

#### 3) *Tsukamurella toyonakaense* の症例 (Kuge *et al.*, 2022)

特に既往のない59歳の女性が胸部X線所見異常のため紹介受診となった。胸部CT所見で中心小葉結節と気管支拡張症が認められた。経過観察中に咳嗽とときおり喀血が出現した。喀痰からは *M. chelonae* が繰り返し確認された。エリスロマイシンと去痰薬による治療を開始した。2年後、*M. chelonae* は喀痰から消

失した。しかし、症状や X 線所見は徐々にではあるが着実に進行し、8 年間にわたり喀痰から同定不能迅速発育菌が繰り返し検出された。培養株はチールネルゼン染色陽性であった。全ゲノム解析により、同定不能菌は *Mycobacterium* 属ではなく *Tsukamurella* 属であり、*T. paurometabola* に遺伝的に近い新種であることが判明し、地名の豊中から *Tsukamurella toyonakaense* と種名を提案した。

### おわりに

コアゲノム MLST による迅速その場同定の方法論と新種がかかわるいくつかの症例を紹介したが、この方法論にはまだ課題がある。この方法論では単離された株からの DNA を出発材料としているため、培養過程が必要である。菌種によっては、4 週間以上の時間が培養に掛かるものもあり、同定過程全体の迅速化としては課題が残る。現在、臨床検体から直接抽出した DNA を出発材料として解析を行い、同定を迅速化するプロトコルの開発を行っている。また今回、大阪府下の病院の症例からのみでも複数の新種が見つかったことから、日本はもとより世界には、われわれがまだ把握していない多様な抗酸菌が存在しているものと推測される。今後、本稿で紹介したような網羅的同定法が普及していくことで、抗酸菌の真の多様性が把握でき、効果的な治療につながっていくものと期待される。

### 謝辞

本研究にご協力頂きました多くの共同研究者、医療機関従事者、臨床検査技師の皆様にご場を借りて感謝を申し上げます。紙面に限りがあるため個別名のご紹介は省略させて頂く失礼をお許し下さい。

### 文献

Abe, Y., Fukushima, K., Matsumoto, Y., Niitsu, T., Nabeshima, H., Nagahama, Y., Akiba, E., Haduki, K., Saito, H., Nitta, T., Kawano, A., Tanaka, M., Matsuki, T., Motooka, D., Tsujino, K., Miki, K., Nakamura, S., Iida, T. & Kida, H. 2022. *Mycobacterium senriense* sp. nov., a slowly growing, non-scotochromogenic species, isolated from sputum of an elderly man. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **72**(5), doi: 10.1099/ijsem.0.005378.

Clarke, J., Wu, H.-C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S.

& Bayley, H. 2009. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.* **4**(4): 265-270.

Gupta, R.S., Lo, B. & Son, J. 2018. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* **9**: 67.

Johansen, M.D., Herrmann, J.-L. & Kremer, L. 2020. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**(7): 392-407.

Kuge, T., Fukushima, K., Matsumoto, Y., Abe, Y., Akiba, E., Haduki, K., Saito, H., Nitta, T., Kawano, A., Kawasaki, T., Matsuki, T., Kagawa, H., Motooka, D., Tsujino, K., Miki, M., Miki, K., Kitada, S., Nakamura, S., Iida, T. & Kida, H. 2020. Pulmonary disease caused by a newly identified mycobacterium: *Mycolicibacterium toneyamachuris*: a case report. *BMC Infect. Dis.* **20**(1): 888.

Kuge, T., Fukushima, K., Matsumoto, Y., Saito, H., Abe, Y., Akiba, E., Haduki, K., Nitta, T., Kawano, A., Tanaka, M., Hattori, Y., Kawasaki, T., Matsuki, T., Shiroyama, T., Motooka, D., Tsujino, K., Miki, K., Mori, M., Kitada, S., Nakamura, S., Iida, T., Kumanogoh, A. & Kida, H. 2022. Chronic pulmonary disease caused by *Tsukamurella toyonakaense*. *Emerg. Infect. Dis.* **28**(7): 1437-1441.

Matsumoto, Y., Kinjo, T., Motooka, D., Nabeya, D., Jung, N., Uechi, K., Horii, T., Iida, T., Fujita, J. & Nakamura, S. 2019. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. *Emerg. Microbes Infect.* **8**(1): 1043-1053.

Namkoong, H., Kurashima, A., Morimoto, K., Hoshino, Y., Hasegawa, N., Ato, M. & Mitarai, S. 2016. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **22**(6): 1116-1117.

Ohkusu, K. 2021. Update on Classification and Identification of Mycobacteria. *Modern Media* **67**: 391-406.

Rapid on-site identification of non-tuberculous mycobacteria  
—Current status and future prospects of microbial genome analysis in clinical practice—

Shota Nakamura, Yuki Matsumoto, Kiyoharu Fukushima and Tetsuya Iida

Department of Infection Metagenomics, Research Institute for Microbial Diseases, The University of Osaka

“Non-tuberculous mycobacteria” (NTM) is a generic name for more than 200 *Mycobacterium* species, excluding seven species of the *M. tuberculosis* complex and *M. leprae*. NTM are widely distributed in soils, rivers, and the oceans, and some are pathogenic to humans. The majority of illnesses caused by NTM are pulmonary non-tuberculous infections. These intractable respiratory diseases require long-term drug treatment due to its inability to respond to antibiotics. They have been associated with an aging population. In Japan, the incidence rate increased from 3.7 per 100,000 population in 2002 to 14.7 per 100,000 in 2014. Although PCR, DNA-DNA hybridization, and MALDI-TOF mass spectrometry have been used to test for pulmonary NTM disease, the slow growth of NTM means a long culture time, and there is no test method that covers their species diversity. Here we introduce a method of rapid on-site identification of NTM using core genome multi-locus sequence typing, and report some cases caused by novel NTM species identified by this approach.