

☒ 2

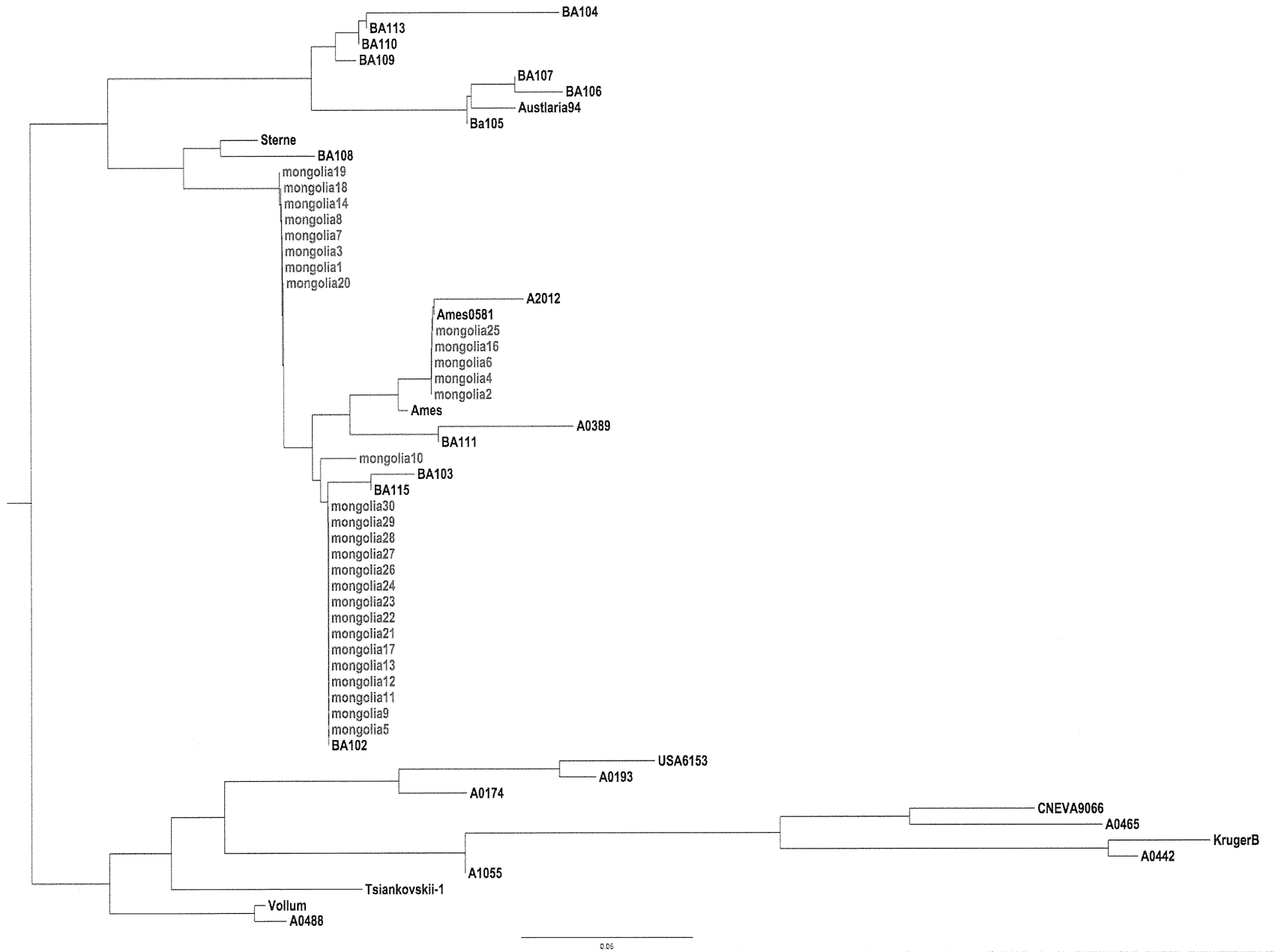
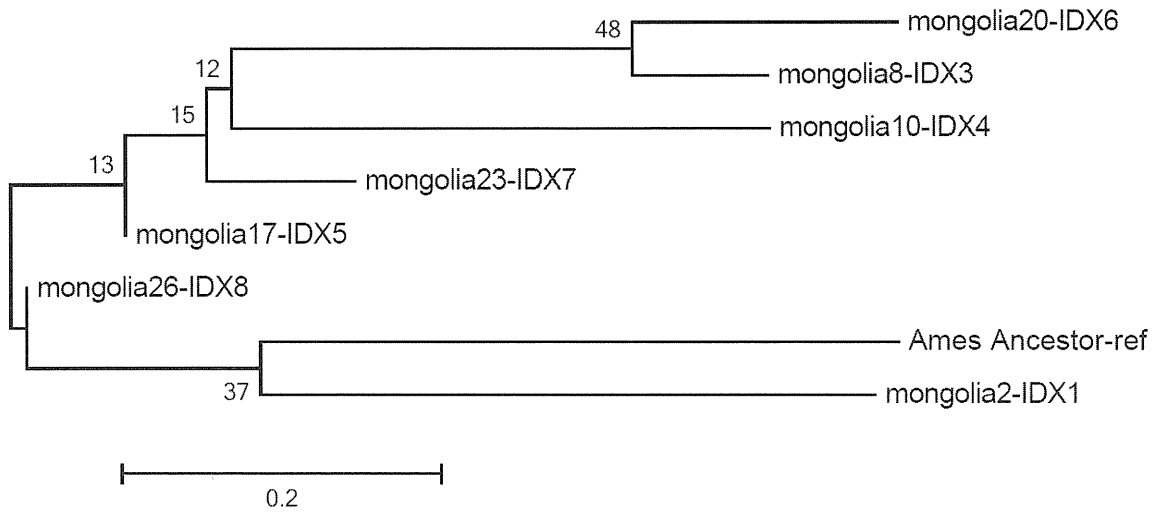


图 3



厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究

分担研究報告書

「ボツリヌス菌株の同定と管理のための遺伝子型別法の検討」

研究分担者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部
協力研究者 山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨：すでに研究機関などに分離株として保管されているテロに使用される可能性のある病原体の遺伝的性状を調べ、比較可能な形にしておくことは、バイオテロに対応策としても有効である。この情報を保管機関の間で共有できるようにしておけば、バイオテロでその病原体が検出された時に保管株との比較が迅速に行え、事態の対処に有用な情報を与える。国立感染症研究所に保管されているボツリヌス菌株をモデルに、比較可能な菌株カタログ化の検討を行った。A型およびA(B)型のボツリヌス菌株についてはMLVA法(Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis)でカタログ化を行うのが、現時点では有効な方法と考えられたので、作業を進めた。B型菌やその他の菌型についても同法が適用できると考えられるが、これらの菌型に合わせた方法の最適化が必要である。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌が生産するボツリヌス神経毒素(BoNT: *Botulinum neurotoxin*)は自然界に存在する最強の毒素とされ、バイオテロに使用されうる物質として警戒されている。BoNTはAからGの7種の血清型が知られており、それぞれヒトや動物に対する毒力は少しずつ異なるが、どの型のBoNTも μg オーダーでヒトに致死的にはたらく。ヒトのボツリヌス症は、ほとんどがA、B、E、F型で起こるので、病気の対応としてはこれらの

毒素型について考えればよい。しかし、バイオテロではどの毒素型が使用されるかわからないので、すべての型への対応を考慮しておく必要がある。

ボツリヌス菌およびBoNTによるバイオテロリズムに対応には、いろいろな手段が考えられるが(図1)、本研究計画ではボツリヌス菌株の管理の側面を検討することにした(図1のトピック7)。ボツリヌス菌が検出されるようなバイオテロが発生した場合、検出された菌株と、すでに知られている菌株との比較を行い、

系統関係があるのかを調べることは、事態の対処に有用な情報を与える。また、テロの防止策にもつながる。これを可能にするには、できるだけ分離能力のある比較的簡便で迅速に行える型別法を選定し、その方法で既存の保管株をカタログ化しておくことである。本研究計画では既存の遺伝子型別法の中で、できるだけ目的にあう方法を選び、この方法によって国立感染症研究所に保管されているボツリヌス菌株の遺伝子型カタログの作成をめざす。日本ではボツリヌス菌は感染症法で二種病原体等に指定されているので、菌株は厳重に管理されており、検査機関間での移動は容易ではない。検査機関間で菌の型別法の共通化と菌株情報の共有化が進めばバイオテロ対策だけではなく、ボツリヌス症発生時の検査機関協力、原因の追及リファレンス業務など日常の行政的なニーズにも役立てられると考えられる。

B. 研究方法

国立感染症研究所、細菌第二部には、過去の国内ボツリヌス症事例などから分離されたボツリヌス菌株が約 70 株保管されている。このうち、比較的最近の事例で分離された菌株 5-10 株程度を対象とし、毒素遺伝子の塩基配列分析、PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)、MLVA (Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) などの方法を試し、カタログ化に適すると思われる方法を選定した。

また、ボツリヌス菌の遺伝子型別法やボツリヌス毒素の検出法に関する新しい

動向について、米国で開催されているボツリヌス関連の会議 IBRCC (The Interagency Botulism Research Coordinating Committee) (第 48 回会議 サンタフェ、NM、2011 年 10 月 5-7 日) に参加し、情報収集を行った。

C. 研究結果

1) 毒素遺伝子の塩基配列分析

感染研、細菌第二部のボツリヌス保管菌株のうち、2006 年から 2010 年までに国内のボツリヌス症例から分離された 6 株について毒素遺伝子の塩基配列を分析した。これら 6 株は A(B)型菌であり、A 型と B 型の毒素遺伝子をもっているが、B 型遺伝子は変異によって毒素発現ができなくなっている(サイレント B 型遺伝子)。

塩基配列解析の結果、6 株の A 型遺伝子は米国の分離菌 NCTC2916 の A 型毒素遺伝子と 100% 一致していることがわかった(図 2)。一方 B 型遺伝子のほうは、塩基配列が株間でわずかに異なっていた。6 株のうち 2 株 (Ibaragi2007 と Iwate2008) は NCTC2916 株の B 型遺伝子と同一だったが、2 株 (Miyagi2006 と Tochigi2008) は 1 塩基異なっており (A53T)、さらに 2 株 (Iwate2007 と Fukuoka2010) は 2 塩基 (A53T、G565A) 異なっていた。結果として、分析した 6 株は、B 型遺伝子の点変異によって 3 グループに分けられることがわかった (図 2)。

2) パルスフィールド電気泳動(PFGE)による分析

上記 6 株の A(B)型菌 を PFGE で分析すると、*SmaI* 切断による分析で 3 種類

の泳動パターン見られた。それぞれのパターンを2株ずつが示し(図3)、6株は、PEGF分析によっても3グループに分けられることがわかった。グループの構成は、6株がB型遺伝子の塩基配列によって分けられた場合と同じだった。

3) VNTR (variable-number tandem-repeat)による分析

Macdonaldらが報告している、10種のVNTRマーカーを利用するMLVA法(Appl. Environ. Microbiol. 74: 875-882)を6株に適用した。その結果、毒素遺伝子の塩基配列分析とPFGEでは区別できなかったIwate2007とFukuoka2010株がMLVA法では区別できることがわかった(図4)。これはIwate2007とFukuoka2010株の間で一つだけVNTRマーカーに違いが見られたためだった(図4、VNTR 3)。

4) MLVA分析のためのフラグメント解析の検討

MLVA法が毒素遺伝子の分析やPFGE法と比べても良好な型別結果を示し、比較的操作も簡便であることから、MLVA法で感染研に保管されているボツリヌス菌株をカタログ化することを計画した。MLVA法では、VNTRマーカーを含むPCR産物の長さを何らかの方法で測定して、菌株間で比較する必要がある。上記の6株についてはDNAシーケンシングによってその長さを求めた。しかし、この方法で多くの菌株を分析することになれば、シーケンシングの作業量が非常に増えてくる。これを回避するため、フラグメント解析によるPCR産物長の測定を検討した。フラグメント解析には

蛍光色素で標識したVNTRマーカー検出用のPCRプライマー、ABI 3130xl シークエンサー、Gene Mapper ソフトウェア(ライフテクノロジー社)を使用して行った。しかし図5に示すようにシーケンシングで求めた場合と、フラグメント解析で求めた場合とではPCR産物長に少し誤差が生じることがわかった。

5) MLVA法のB型菌への応用

Macdonaldらによるボツリヌス菌のMLVA分析の原著論文(前出)では、同法をB型に適用したデータが少し記載されている。本法はA型菌をもとにしてデザインされた方法であるが、B型菌への適用もある程度可能だろうと考えられた。感染研保管株のうち8株のB型菌にMLVA法を適用した。その結果、A型菌に適用した場合とは異なり、菌株ごとにPCR産物がうまく増幅できないVNTRマーカーが出てきた(図6)。不都合のあるVNTRマーカーを外しても、系統樹を作成することは可能で、菌株が同一でないことを見分ける方法として使用することはできたが、より高精度な菌株の比較を行うには、B型菌用のVNTRマーカーの設定などの改良が必要だと考えられた。

D. 考察

研究機関などに保管されているボツリヌス菌株を適正に管理しておくことは、バイオテロの防止上重要である。日本では二種病原体等に指定することによって、その所持や管理、移動は厳重に規制している。一方、公衆衛生活動の場では、ボツリヌス菌を扱う検査機関、リファレンス機関の間で菌株の情報を共有し、疫学

調査などに役立つことは重要なことである。菌株の移動が困難な現状下、各検査機関、リファレンス機関で分離、保管しているボツリヌス菌株の遺伝子情報をカタログ化しておき、新たにボツリヌス菌が分離された場合に、新分離株と保管株をスムーズに比較できるように準備しておくことは有用なことと思われる。これは結局、既存のボツリヌス保存菌株の素性を明らかにし、バイオテロへの流用の抑止にもつながる。

ボツリヌス菌の遺伝子型別法は 1) BoNT およびその関連遺伝子の塩基配列分析、2) PFGE 法、3) MLST 法 (Multi locus sequence typing) 法、4) AFLP 法 (Amplified fragment length polymorphism)、5) MLVA 法などが利用されている。また、今後は次世代型 DNA シークエンサーなどの技術を利用して 6) 大規模なゲノム配列解読に基づく遺伝子型別、が利用されるようになってくると思われる。再現性、簡便性、コストなどを考えればこれらの方法は、みな一長一短がある。本研究で意図するボツリヌス菌株のカタログ作成に適した方法を選択するために、感染研で過去に分離した 6 株の A(B)型ボツリヌス菌株について、1) 毒素遺伝子塩基配列分析、2) PFGE 法、5) MLVA 法を適用して評価した。通常、毒素遺伝子の塩基配列解析のみでは、菌株の区別ができないこともあるが、今回分析した 6 株は B 型遺伝子の 2 塩基の違いにより、2 株ずつ 3 グループに分けられた。PFGE 法と MLVA 法も 6 株をこの 3 グループに分類したが、MLVA 法は他法では区別できない Iwate2007 と

Fukuoka2010 株を区別することができた。MLVA 法は作業も比較的簡便に行え、数値化した結果を得るため、別の機関で得られた結果も比べやすい。MLVA 法は本研究で目的とするボツリヌス菌株のカタログ化に適した方法だと考えられた。A 型、A(B)菌については、MLVA 法によって保管株のカタログ化を進めることにした。本研究では MLST と AFLP 法を試さなかったが、MLST は塩基配列分析が大量に必要で、多くの菌株をカタログ化する用途では作業量が大きくなる考えたためである。また AFLP 法は使用する機器や操作法によって、実験室間で結果にばらつきが生じやすいと思われる。

MLVA 法で PCR 産物の長さを求める作業を効率するために Gene Mapper システムによるフラグメント解析を検討した。その結果、シーケンシングで求めた PCR 産物長とフラグメント解析で求めたものには、少しずれが生じた。メーカーに確認したところ、機器の性質上、この程度の塩基数のずれは生じてしまうとの回答だった。しかし、前出の Macdonald らの論文では、Gene Mapper システムを使用して、シーケンシングで求めたような正確な値が記載されているように読めた。この点を IBRCC 会議に参加した際に、この論文グループの代表者である Karen Hill 博士 (米ロスアラモス国立研究所) にたずねたところ、Gene Mapper を基本的に使用しているが、論文に載せているデータはシーケンシングによって正確な値に補正したものであるとの回答だった。このため、我々も、菌株のカタログ化を目的とする MLVA 法ではシー

クエンシングによって、PCR 産物長のデータを取得することにした。

MLVA 法を B 型菌に適用したところ菌株ごとに PCR がうまくかからない VNTR マーカー存在し、問題があることがわかった。これは本研究で利用している VNTR マーカーがもともと A 型菌用にデザインされたものであることと、B 型菌は A 型菌よりも菌株間のバリエーションが大きいことがあげられる。ボツリヌス菌は生化学的性状によって I 群から IV 群菌に分けられている。B 型のボツリヌス菌にはタンパク質分解性のある菌とない菌があり、前者は I 群菌に後者は II 群菌に分類されている。このような B 型菌のバリエーションがすべての菌株に有効な VNTR マーカーの設定を難しくしている。我々も 15 個ほど VNTR マーカーを新たに設定し、B 型菌に試用しているが、最適なマーカーはまだ設定できていない。現状でも、B 型菌の簡易的な区別には、かなり有用な手段にはなるが、本研究計画では菌株のカタログ化を目的としているため、より精度の高い分類ができる VNTR マーカー必要とされる。

VNTR マーカーを独自に設定することは、技術的には難しいことではない、しかし、すでに先行して報告されているマーカーを利用すれば、そのマーカーで分析された海外の菌株との比較も可能になる。今回 A 型菌の分類で Macdonald らの論文の VNTR マーカーを踏襲したのはそのためである。

感染研保管株の中には E 型菌と F 型菌の株もあるので、これらの菌株のカタログ化にはまた新たな方法を検討していく

必要がある。

E. 結論

MLVA 法を用いて A 型、A(B)型菌のボツリヌス菌保管菌株はカタログを作成するめどがついた。しかし、B 型菌では、簡易的レベルでの菌株の区別には MLVA 法が利用できるが、より精度の高いカタログを作成するには、VNTR プライマーの再設定などの改良が必要である。その他の菌型についても、今後、型別方法を開発していく必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

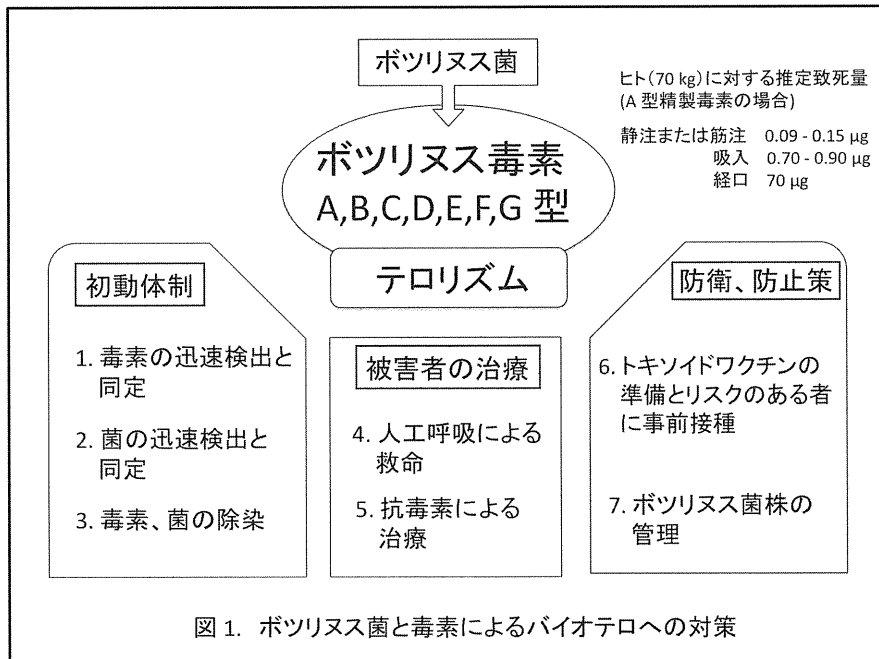
なし

2. 学会発表

Kenri, T. et al. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* strains isolated from infant botulism cases in Japan in 2011, 48 th Interagency Botulism Research Coordinating Committee, October, 5-7, Santa Fe, NM, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

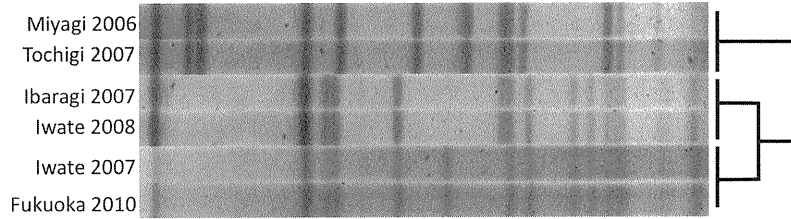
なし



	分離菌	地域(年)	症例	毒素型	A型遺伝子	(B)型遺伝子
1	Miyagi2006	宮城(2006)	乳児ボツリヌス	A(B)	3891/3891 (100%)	3868/3869 (99%)
2	Iwate2007	岩手(2007)	乳児ボツリヌス	A(B)	3891/3891 (100%)	3867/3869 (99%)
3	Ibaragi2007	茨城(2007)	乳児ボツリヌス	A(B)	3891/3891 (100%)	3869/3869 (100%)
4	Tochigi2007	栃木(2008)	成人、原因不明	A(B)	3891/3891 (100%)	3868/3869 (99%)
5	Iwate2008	岩手(2008)	乳児ボツリヌス	A(B)	3891/3891 (100%)	3869/3869 (100%)
6	Fukuoka2010	福岡(2010)	乳児ボツリヌス	A(B)	3891/3891 (100%)	3867/3869 (99%)
	NCTC2916	USA (1929)	食中毒	A(B)	3891	3869

		(B)遺伝子の変異部位	
		53	565
1	Miyagi 2006	T	G
2	Iwate 2007	T	A
3	Ibaragi 2007	A	G
4	Tochigi 2007	T	G
5	Iwate 2008	A	G
6	Fukuoka 2010	T	A
	NCTC2916	A	G

図 2. 2006年から2010年に日本で分離された A(B)型ボツリヌス菌の毒素遺伝子塩基配列分析



SmaIによる切断パターン

図 3. PFGE による分析

分離菌		VNTR									
1	Miyagi2006	527	387	397	401	300	432	505	421	406	485
2	Iwate2007	586	401	367	401	318	375	545	421	370	436
3	Ibaragi2007	631	401	367	401	318	465	525	421	370	436
4	Tochigi2007	527	387	397	401	300	432	505	421	406	485
5	Iwate2008	631	401	367	401	318	465	525	421	370	436
6	Fukuoka2010	586	401	373	401	318	375	545	421	370	436
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

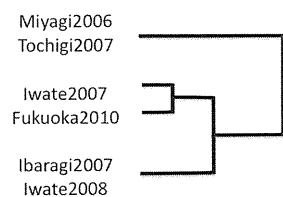
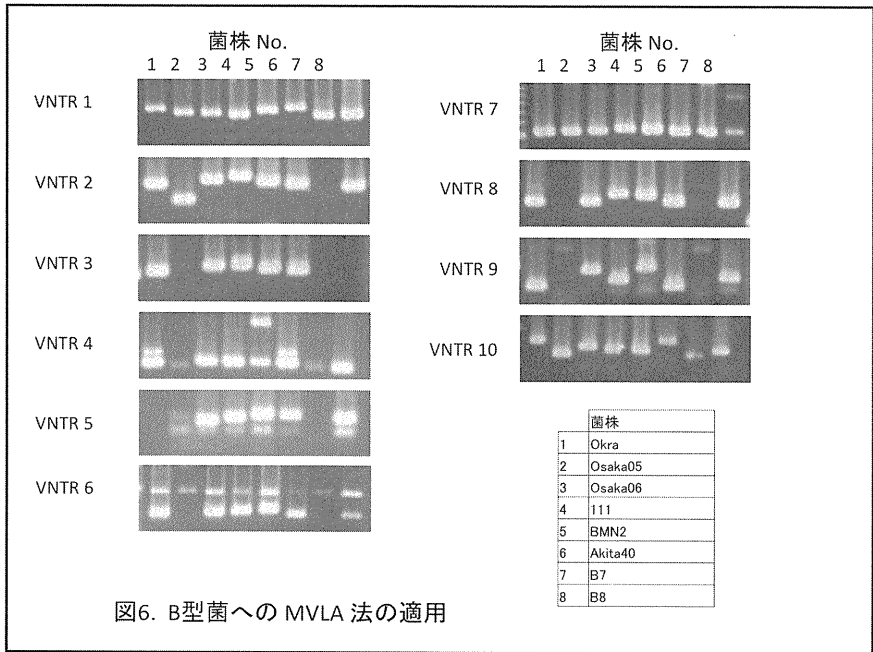
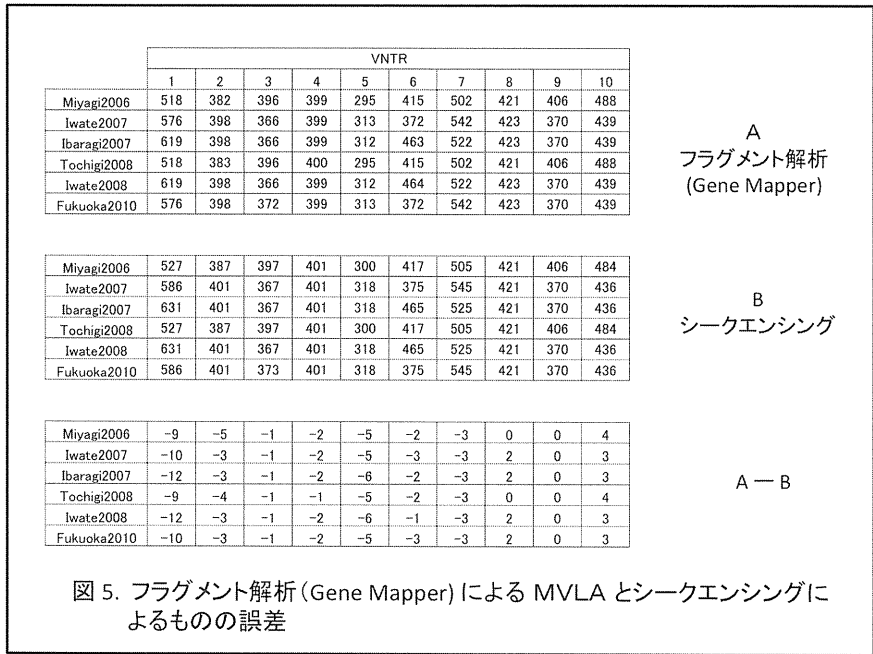


図 4. MVLA による分析



厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等 新興・再興感染症研究事業)
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

リケッチア・クラミジアの迅速検出法の開発
リケッチアの多様性への対応の必要性に関する考察

研究分担者 安藤 秀二 国立感染症研究所ウイルス第一部 室長
研究協力者 藤田 博己 大原総合病院附属大原研究所
研究協力者 小笠原由美子 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：バイオテロに使用される可能性のあるとして、米国でセレクトエージェントに指定されているロッキー山紅斑熱リケッチア *Rickettsia rickettsii* を含む紅斑熱群リケッチアには、多様なリケッチア種があることが知られている。輸入症例から分離されたリケッチアは、これまで報告のない遺伝子配列を示していたことから、紅斑熱群リケッチアに関しては、今後もその多様性が広がる可能性がある。バイオテロを想定した場合、多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系を準備すべきか考慮する必要がある。

A. 研究目的

バイオテロのエージェントとして米国のセレクトエージェントに指定されているロッキー山紅斑熱リケッチア *R. rickettsii* は紅斑熱群リケッチアの一つとして分類されている。現在まで、紅斑熱群リケッチアには多様なリケッチア種があることが知られている(参考 表)。われわれの研究室では、国内に常在するつつが虫病や日本紅斑熱などのリケッチア症、さまざまなベクターからのリケッチアの検出の他、多様な輸入リケッチア症を診断、経験している。リケッチア症の多様性に関し、どこまで広く対応・検出すべきか、可能かを考察するため、2011年に経験した輸入例から分離されたリケッチアの遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. 海外輸入例からのリケッチア症の確認
アジア地域から帰国した熱性疾患の患者の鑑別診断依頼に基づき、間接蛍光抗体法によるペア血清を用いた抗リケッチア抗体価の測定、また、急性期全血ならびに発疹部皮膚生検材料からリケッチア特異遺伝子の検出のため、リケッチア属の *17kDa* タンパク遺伝子、*gItA*、*ompA* を標的としたPCRを行った。検出されたバンドについてはダイレクトシークエンスを行った。
2. リケッチアの分離・同定
急性期全血をL929細胞に接種、培養し、リケッチアの分離を試みた。
3. 分離リケッチアの解析
分離されたリケッチアからリケッチアのゲノムDNAを抽出し、複数の遺伝子領域につ

いて解析(Multi locus sequencing)を行った。

(倫理面への配慮)

必要なし

C. 研究結果

1. リケッチア症患者の確認

Orientia tsutsugamushi Karp/Gilliam, *R. japonica*, *R. conorii*, *R. typhi*, *R. prowazekii*を抗原に用い、ペア血清抗体価を確認したところ、6病日いずれも陰性であったものが、12病日で*R. japonica*並びに*R. conorii*に対する抗体価が640倍以上と上昇した。リケッチア特異的遺伝子検出のPCRでは、全血材料において*ompA*のみ陽性となり、ダイレクトシーケンスの結果、紅斑熱群リケッチアのクラスターにはいるものの、これまで知られているリケッチア種とは異なるシーケンス配列であった(図1)。

2. リケッチアの分離・同定

分離に成功したリケッチアについて、臨床検体で検討したPCR標的に加え、*16S rRNA*、*geneD (Sca4)*遺伝子についても検討した。すべての標的においてPCR陽性となり、シーケンス解析の結果、*ompA*のPCR産物は、臨床検体(急性期全血)から直接検出した遺伝子配列と完全に一致した。他のPCR産物の配列は、*ompA*ほど他のリケッチア種との相同性は低くないものの、既報のリケッチア種とは異なる配列であった。

D. 考察

*R. japonica*ならびに*R. conorii*に対する抗体価の上昇が明らかであったこと、渡航先の情報から、当初、本症例は*R. conorii* subsp. *indica*と推測した。しかし、分離されたリケッチアは、これまで国内、海外でも報告のないものであった。臨床検体(急性期

全血)から直接PCR法によって検出できたものは、*ompA*領域のみであった。データベースに登録されていた情報は、唯一インドの研究者グループが登録した配列の長さが異なる同領域の情報のみで、登録された遺伝子の由来材料と同じものからの他の遺伝子領域の情報は登録されていなかった。分離株を得たことによって他の複数の遺伝子領域も解析できたが、これまでデータベースには登録がないものであった。

リケッチア症の検査目的において、*ompA*領域を標的としたPCRは、必ずしも第一の標的でないため、通常の検査プロトコールでは確定できないリケッチアであった。また、リケッチア症を疑う臨床検体からの直接PCR法を実施する場合、刺し口や発疹部皮膚生検材料からの検出が推奨されているものの、今回の症例では、検体の保存状態からDNAの抽出自体が難しく、全血からの抽出DNAのみがPCR法へ供試可能であった。また、当室でルーチンに使用しているPCR増幅酵素ではシーケンス解析に供するに十分な増幅ができず、より増幅効率の高い酵素に変更することによって検出、シーケンス解析が可能となった。リケッチア症は、原因となるリケッチア種が紅斑熱群に分類された場合でも、その症状は多様であり、臨床症状からリケッチア症を疑うことが難しいことも少なくない。リケッチア症ならびにその原因となるリケッチア種の多様性が示されるなかで、今後、より広範なリケッチアに特異性、感度の高い遺伝子検出系の準備が必要である。そのためには、今回検討した分離リケッチアを含め、より多くのリケッチア遺伝子の情報を集め、データベース化することも必要であろう。

E. 結論

リケッチア症の原因となるリケッチア種

は多様である。バイオテロを想定した場合、多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、どれだけの感度、特異性をもって迅速診断系を準備するべきか考慮する必要がある。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安藤秀二, 発疹熱・発疹チフス・日本紅斑熱, 今日の治療と看護 改定第3版, in press
- 2) 安藤秀二, 日本紅斑熱, 獣医公衆衛生研究, 12(2) in press
- 3) 安藤秀二, リケッチア, 平松啓一監修、中込治、神谷茂編集, 標準微生物学, 第11版
- 4) 安藤秀二, 最近の輸入発疹熱事例について. 人と動物の共通感染症研究会のニューズレター, 10: 4-6, 2011年10月
- 5) 安藤秀二 病原体等の保存・保管と輸送, バイオメディカルサイエンス研究会編, バイオセーフティの原理と実際、医学評論社. P112-121、2011年6月
- 6) Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, Acta Dermato-Venereologica, doi: 10.2340/15555-1313
- 7) 成田雅、鵜沼菜穂子、伊藤文人、佐藤憲行、星野智祥、井上実、山本正悟、安藤秀二、

藤田博己: 11月熱 福島県中南部におけるタテツツガムシ媒介性つつが虫病, 日本内科学会誌, 101: 164-167, 2012

2. 学会発表

- 1) Shuji ANDO, Trend of rickettsioses in Japan, 6th International meeting of Rickettsiae and rickettsial Diseases, Crete, Greece, 5-7 Jun 2011
- 2) 安藤秀二、小笠原由美子: 2011年に経験した多様な輸入リケッチア症、第18回リケッチア研究会、大阪、平成24年2月12日
- 3) 安藤秀二: 宮古島のつつが虫病の国内外における位置づけと今後の検査対応について、つつが虫病に関する調査報告会、沖縄県宮古島市、平成24年1月23日
- 4) 安藤秀二: ズーノーシスとしての偏性細胞内寄生細菌の自然界におけるリスク、第11回日本バイオセーフティ学会、筑波、平成23年12月2日
- 5) 安藤秀二、リケッチア症、第6回輸入感染症講習会、東京、平成23年9月24日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

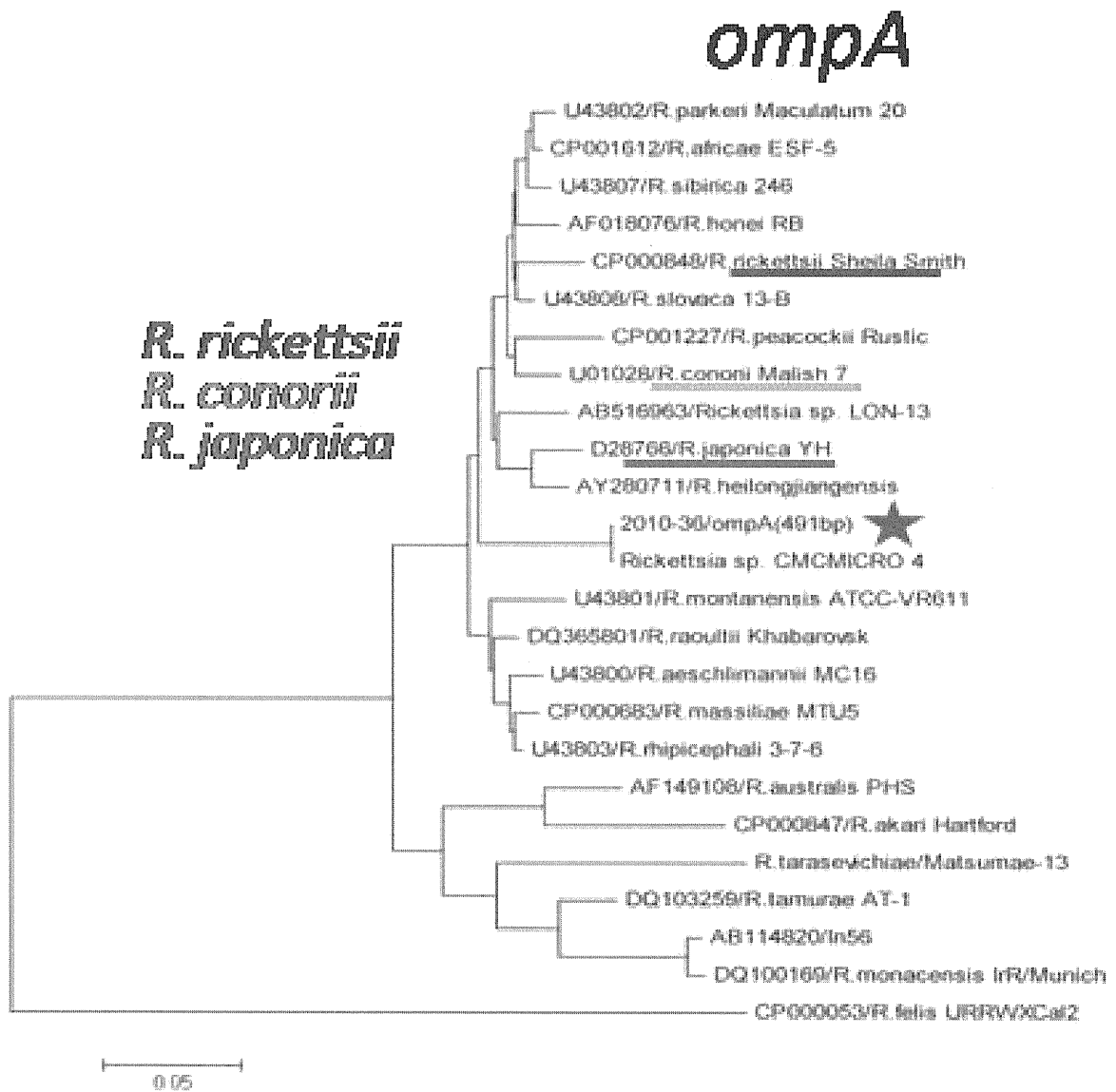


図1 検出・分離されたリケッチアのompA領域の系統樹

<参考>Parola et al. Clin Microbiol Rev, 18: 719-756, 2005より改変

TABLE 1. SFG rickettsiae of unknown pathogenicity isolated or detected in ticks(Clin Microbiol Rev. 2005 October; 18: 719-756)

Rickettsia sp. or strain(s)	Confirmed or potential tick vector(s)	Locations
Available strains		
<i>R. peacockii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	US
<i>R. montanensis</i> (formerly <i>R. montana</i>)	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor andersoni</i>	US
<i>R. bellii</i>	<i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Amblyomma</i> , <i>Ornithodoros</i> . <i>Argas</i>	US, Brazil
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Rhipicephalis sanguineus</i> , <i>Dermacentor occidentalis</i>	US, Europe, Africa
<i>R. monacensis</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europe
" <i>R. tamurae</i> "	<i>Amblyomma testudinarium</i>	Western Japan
" <i>R. asiatica</i> "	<i>Ixodes ovatus</i>	Central Japan
Strain S	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Armenia
Nonclassified, incompletely characterized, or uncultivated rickettsiae awaiting further characterization		
Strain Cooley	<i>Ixodes scapularis</i>	US
Strain 364-C	<i>Dermacentor occidentalis</i>	US
Strain Parumapertus	<i>Dermacentor parumapertus</i>	
Strain Tillamook	<i>Ixodes pacificus</i>	US
Unnamed	<i>Ixodes cookei</i>	
Unnamed	<i>Amblyomma longirostre</i>	Brazil
Strain COOFERI	<i>Amblyomma cooperi</i>	Brazil
*Candidatus <i>Rickettsia andeanae</i> *	<i>Amblyomma maculatum</i> , <i>Ixodes boliviensis</i>	Peru
Strain RDIa420	<i>Dermacentor auratus</i>	Thailand
Strain RDIa440	<i>Dermacentor</i> spp.	Thailand
Strain ATT	<i>Amblyomma testudinarium</i>	Thailand
Strains HOT1 and HOT2	<i>Haemaphysalis ornithophila</i>	Thailand
Strain RpA4	<i>Rhipicephalus pumilio</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Dermacentor niveus</i>	Europe
Strains DnS14 and DnS28	<i>Dermacentor nutalli</i> , <i>Dermacentor silvarum</i> , <i>Dermacentor niveus</i>	Siberia, Kazakhstan
*Candidatus <i>Rickettsia tarasevichiae</i> *	<i>Ixodes persulcatus</i>	Russia
Strain R300	<i>Haemaphysalis juxtakoehi</i>	Brazil
<i>Rickettsia midichlori</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	US
Strain AaR/SoCarolina	<i>A. americanum</i>	US
" <i>R. moreli</i> "	<i>Ixodes ricinus</i>	Spain
*Candidatus <i>Rickettsia principis</i> *	<i>Haemaphysalis japonica douglasi</i>	Far Eastern Russia
<i>Rickettsia</i> sp	<i>Amblyomma triguttatum</i>	Barrow Island, northwest coast of western Australia

Philippe Parola,1 Christopher D. Paddock,2 and Didier Raoult1

Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts

Clin Microbiol Rev. 2005 October; 18(4): 719-756.

TABLE 2.Characteristics of known and potential tick-borne rickettsiae, 2005

Rickettsia sp.	Recognized or potential tick vector(s)	Yr of first identification in ticks	Disease (yr of first clinical description)
Confirmed pathogens			
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> , <i>Amblyomma aureolatum</i>	1906	Rocky Mountain spotted fever (1899)
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1932	Mediterranean spotted fever (1910)
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1974	Israeli spotted fever (1940)
<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	<i>Dermacentor nutalli</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Dermacentor silvarum</i> , <i>Haemaphysalis concinna</i> , <i>Dermacentor siaticus</i>	Unknown	Siberian tick typhus (1934)
<i>Rickettsia australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> , <i>Ixodes tasmani</i>	1974	North Asian Tick typhus (1977)
<i>Rickettsia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i> , <i>Dermacentor taiwanensis</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Haemaphysalis flava</i>	1974	Queensland tick typhus (1946)
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Rhipicephalus pumilio</i>	1992	Astrakhan fever (1970s)
<i>Rickettsia africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>Amblyomma variegatum</i>	1990	African tick bite fever (1934)
<i>Rickettsia honei</i>	<i>Aponomma hydrosauri</i> , <i>Amblyomma cajennense</i> , <i>Ixodes granulatus</i>	1993	Hindars Island spotted fever (1991)
<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolotimonae</i>	<i>Hyalomma asiaticum</i> , <i>Hyalomma truncatum</i>	1991	Lymphangitis associated rickettsiosis (1988)
<i>Rickettsia slovaca</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>	1968	Tick-borne lymphadenopathy (1997), <i>Dermacentor</i> borne necrosis and Far Eastern spotted fever (1992)
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Dermacentor silvarum</i>	1982	
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> , <i>Hyalomma marginatum rufipes</i> , <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	1997	Unnamed (2002)
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Amblyomma maculatum</i> , <i>Amblyomma americanum</i> , <i>Amblyomma triste</i>	1939	Unnamed (2004)
<i>Rickettsia massiliae</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Rhipicephalus turanicus</i> , <i>Rhipicephalus lusitanicus</i> , <i>Rhipicephalus salicatus</i>	1992	Unnamed (2005)
" <i>Rickettsia marmionii</i> "	<i>Haemaphysalis novaequiae</i>	2003-2005	Australian spotted fever (2005)
Potential pathogens			
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>indica</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1950	Indian tick typhus
<i>Rickettsia canadensis</i>	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	1967	
<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Amblyomma caryanense</i> , <i>Amblyomma coolidgei</i>	1974	Unnamed (1993)
<i>Rickettsia texiana</i>	<i>A. americanum</i>	1943	Bullis fever (1942)
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i> , <i>Ixodes trianguliceps</i>	1979	Unnamed (1995)

Philippe Parola,1 Christopher D. Paddock,2 and Didier Raoult1

Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts

Clin Microbiol Rev. 2005 October; 18(4): 719-756.

マーカーは日本に存在することが知られている紅斑熱群リケッチア

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究

分担研究報告書

バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 生物活性物質部長

研究協力者 田辺公一（国立感染症研究所生物活性物質部）

研究要旨：バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラスマ (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養をしない検査技術が必要とされる。本研究では、喀痰などの臨床検体からヒストプラスマなどの病原真菌 DNA の検出法を複数比較検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を見出し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とした。今年度は、nested PCR、リアルタイム PCR（インターカレーター法、Taqman probe 法）によるヒストプラスマ DNA の検出を行い、感度の比較検討を行った。

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植、抗癌剤治療などの免疫不全患者で見られる日和見型の感染症に注目が集まっていたため、健常者に発症する公衆衛生学的に重要な真菌症の対応が先送りされていた。しかし近年、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が認識された。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラ

スマ (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は日本国内には定着しておらず、海外でも特定の地域・気候でしか生息できない菌であると考えられており、地域流行型真菌症の原因菌として位置づけられている。いずれの菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染まで進行すると致死率は極めて高くなる。また、コクシジオイデス、ヒストプラスマについては、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養も推奨されておらず、培養をしない検査技

術が必要とされる。

本研究では、喀痰などの臨床検体からヒストプラズマなどの病原真菌 DNA の検出法を複数比較検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を見出し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

3つの想定される真菌症のうち、ヒストプラズマ症をモデルケースとして研究対象に選んだ。国立感染研、生物活性物質部において分離された *Histoplasma capsulatum* genome DNA を用いて nested PCR、realtime PCR によって感度特異性を検証する。

PCR で標的とする遺伝子検出には M 抗原遺伝子および、100kDa タンパク質遺伝子を選択した。Realtime PCR については SYBERgreen を用いたインターカレーター法と Taqman probe 法の双方を検討した。

Histoplasma genome DNA は生物活性物質部で過去に臨床検体から分離した *Histoplasma capsulatum* より抽出した DNA サンプルを用いた。

(倫理面からの配慮について)

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

C. 研究結果

1) nested PCR による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出感度の検討

10ng から順次希釈した *H. capsulatum* DNA を鋳型とし、M 抗原遺伝子を標的とした nested

PCR を行った。目的領域の増幅はアガロースゲル電気泳動にて確認し、増幅断片の塩基配列を決定し、非特異的増幅ではないことを確認した。

アガロースゲル電気泳動において、1fg まで遺伝子の増幅を確認できた。また、陰性コントロールとして、*Aspergillus*、*Candida*、*Cryptococcus*、*Trichosporon*、*Penicillium* などの真菌から調整したゲノム DNA を用いて第一段階 PCR を行ったが、増幅は認められなかった。

2) インターカレーター法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質遺伝子について nested PCR で感度・特異性ともに良好な成績の認められた領域と、ソフトウェア (PrimerExpress) が選択した領域についてプライマーをデザインした。リアルタイム PCR については、SYBR Premix Extaq (TAKARA) を用い、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質遺伝子について、いずれも 10pg のゲノム DNA を検出することができた。

3) Taqman probe 法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

インターカレーター法で標的とした増幅領域の中央付近に Taqman probe を設定し、TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) を用いて実験を行った。Taqman probe を用いることで感度の向上が期待されたが、予想とは反対に、M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質遺伝子ともに 1ng のゲノム DNA が検出限界であった。

D. 考察

Nested PCR による *Histoplasma* DNA の検出感度は非常に高く、計算上 1fg のゲノム DNA が含まれるサンプルにおいてもバンドが観察された。しかしながら、ゲノムサイズから換算すると 1 細胞に含まれるゲノム DNA は約 40 fg であり、M 抗原遺伝子は遺伝子上に 1 コピーしかない。したがって、今回の検討での検出感度の算出は正確ではなく、ストック DNA の濃度の測定が正確でないかあるいは希釈系列の作製が正確にできていなかった可能性が考えられる。いずれにせよ、Nested PCR の感度は非常に高く、現時点では環境サンプルなどのごく微量の *Histoplasma* が含まれるサンプルにおける最も有力な遺伝子検出法であると考えられた。

Nested PCR は感度が高い一方で、操作が煩雑であり、第一段階 PCR 産物のコンタミによる擬陽性の問題点がある。この問題点を克服するために、二種類のリアルタイム PCR 実験系の構築を試みた。

インターカレーター法では 10ng の *Histoplasma* DNA まで検出することができたが、nested PCR と比較すると感度において劣っていた。Taqman probe を用いたリアルタイム PCR においては特異性が上昇することから、非特異的な反応が抑制されることで若干の感度の向上が期待されたが、むしろインターカレーター法よりも感度が低いという結果になった。いずれのリアルタイム PCR 法においても PCR のサイクルは 40 サイクルのみであり、80 サイクル反応を行う nested PCR に匹敵する感度を実現す

ることは困難なのかもしれない。

ただし、近年の遺伝子解析手法の進歩は著しく、PCR に関しては好感度の DNA ポリメラーゼやキットが次々と開発されている。最新の遺伝子解析技術情報を参考にしながら、実験系の改良を続けていけば、高い感度と特異性をもち、なおかつ粗精製サンプルからでも遺伝子の検出が可能な実験系の構築が可能になると期待される。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Tanabe K](#), Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes AR, Miyazaki Y, Cannon RD, Monk BC, Niimi M. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Mol Microbiol.* 82(2):416-33, 2011.
- 2) Nakayama H, Ueno K, Uno J, Nagi M, Tanabe K, Aoyama T, Chibana H, Bard M. Growth defects resulting from inhibiting ERG20 and RAM2 in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol Lett.* 317(1):27-33, 2011.

2. 学会発表

- 1) [田辺公一](#), 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継. *Candida glabrata* 臨床分離株におけるキャンディン感受性と *FKS* 遺

- 伝子の解析. 真菌分子細胞研究会、香川、2011 (11月)
- 2) 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 知花博治, 梶原 将, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール獲得機構の解明. 真菌分子細胞研究会、香川、2011 (11月)
- 3) 大野秀明、大川原明子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、泉川公一、藤井 毅、竹村 弘、岸 一馬、河野 茂、宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)
- 4) 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)
- 5) 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* Msp1 キナーゼの生化学的・遺伝学的アプローチによる解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10月)
- 6) 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)
- 7) 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)
- 8) 山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の分泌蛋白 B11 およびそのホモログの検出系と病原性について. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)
- 9) 田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラズマ属の検出. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10月)
- 10) 大野秀明、田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会、東京、2011 (6月)
- 11) 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6月)
- 12) 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の Mps1 キナーゼの新たな抗真菌薬ターゲットとしての可能性の検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6月)
- 13) 山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸

弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継。
Aspergillus 属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチ ELISA 法によるアスペルギルス症診断系構築の試み。第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)

1 4) 徳山承明、眞木二葉、竹村 弘、高木妙子、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、亀井克彦、長谷川泰弘。日本人 AIDS 患者に発症したマルネツフェイ型ペニシリウム症の一例。第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)

1 5) 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、宮崎義継。国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状。第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)

1 6) 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、渡邊 浩、宮崎義継。福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例からの分

離株の MLST 法による疫学的検討。第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)

1 7) 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、宮崎義継。遺伝子診断法を用いた土壌中に生息するヒストプラスマ属検出の試み。第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし