

E 型の BoNT のエンドペプチダーゼ活性を簡便に検出する方法を検討した。

B. 研究方法

1) BoNT の活性を検出するために、その基質となるタンパク質分子をデザインし、組換えタンパク質として大腸菌で生産する。2) 生産した基質タンパク質が、BoNT によって切断されるかを確認する。3) 目的の基質タンパク質が作製できたら、BoNT による切断を簡便に効率よく検出する方法を検討し、BoNT の有効な検出法とする。

C. 研究結果

1) SNAP25 を含む基質タンパク質のデザインと生産

マウスの SNAP25 タンパク質は 206 個のアミノ酸からなるが、この遺伝子の全長または部分をタカラバイオ社の pCold ProS2 発現ベクターに挿入した。さらに SNAP25 遺伝子の下流には蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を挿入した。これを大腸菌に導入し、図 1 に示すような ProS2-SNAP25-EYFP の構造をもつ一連の基質タンパク質分子を生産した。このうち、SNAP25 全長を含む 1F 組換えタンパク質は大腸菌での生産量が少なかった。SNAP25 の N 末側には疎水性のドメインがあり、このドメインの影響で大腸菌での 1F タンパク質の発現量が低かったのではないかと推測された。生産量の少ない 1F は使用せず、71F、141F、185F の各組換え基質タンパク質について、BoNT による切断実験を行った。

2) A 型の BoNT による組換え基質タンパク質の切断実験

71F、141F、185F の組換え基質タンパク質を A 型の BoNT で処理したところ 71F と 141F は 1000 あるいは 100 マウス LD₅₀/ml の A 型 BoNT によって、ほぼ同等に切断されたが 185F は切断されなかった(図 2)。185F は SNAP25 の N 末側を短くし、E 型の BoNT による切断部位は除いている。185F が切断されないのは、A 型の切断点は残っていても A 型 BoNT によって認識されるのに必要な部分が除かれてしまっているためと考えられた。

この実験では、文献情報などをもとに BoNT 切断に適した反応液組成も検討し、図 2 に示した反応条件を選択した。反応液組成を簡略にするため、反応液からゼラチンを除くことも検討したが、0.2%程度のゼラチンが存在したほうが、BoNT の反応性がよかった。図 2 の SDS-PAGE にスメアのようなバックグラウンドが生じているのは反応液に加えたゼラチンだと考えられる。また、SDS-PAGE では基質タンパク質の量がある程度多量に存在しないと検出できないため、反応液に比較的濃い濃度 (150-250 μ g/ml) の基質タンパク質を加えている。

71F と 141F は A 型 BoNT によって同等な切断を受けたため、以下の実験では 71F 基質を使用した。

3) アジレント バイオアナライザーを使用した BoNT 切断産物の検出

SDS-PAGE では、i) 反応液中のゼラチンによってバックグラウンドのスメアが

生じること、ii) 基質タンパク質を多く使う必要があること、iii) 分析に時間を要する(泳動と染色で3~4時間程度)などの問題点がある。そこでアジレント・テクノロジー社の Agilent 2100 バイオアナライザーの利用を検討した。この装置で利用できる Agilent High Sensitivity Protein 250 キットは、分析するタンパク質をあらかじめ蛍光色素で標識するため pg オーダーのタンパク質が 30 分程度で検出される。

ゲル濾過で精製した 71F 基質を Protein 250 キットでラベルした後、A 型および E 型の BoNT と 2 時間、至適条件で反応させ、これをバイオアナライザーで分析した(図 3)。この分析では、プレラベルされた 71F のみが検出されるので、SDS-PAGE で分析したときのようなゼラチンのスメアは見られなくなっている。71F 基質とその切断産物のバンド以外に薄く出現しているのは、71 基質の精製時に除去しきれなかった不純物のバックグラウンドだと思われる。検出感度が高いため、反応液に加えた 71F 基質の濃度も $5 \mu\text{g/ml}$ であり、SDS-PAGE の 1/30~1/50 程度になっている。この 71F 基質の使用量はもう少し下げることができる。結果は A 型と E 型の BoNT が 10 マウス LD_{50}/ml の場合でわずかに 71F の切断産物が検出でき、100 マウス LD_{50}/ml の場合は、これが明確に検出された(図 3 切断産物)。また、SNAP25 の A 型と E 型の BoNT による切断部位は 17 アミノ酸はなれているので(図 1)、A 型で切断した場合と E 型で切断した場合は切断産物に分子量の違いが生じ、これもバイオア

ナライザーで検出されている(図 3、切断産物)。この分析法では、検出されている BoNT が A 型か E 型かを見分けることもできる。

D. 考察

今回 A、C、E 型の BoNT の標的である SNAP25 を含む組換えタンパク質を生産し、これを基質とすることによって、BoNT 活性を検出するシステムを構築した。精製 BoNT による評価の結果、このシステムでは、A 型と E 型の BoNT が 100 マウス LD_{50}/ml 以上存在すれば約 3 時間で明確に検出可能なことがわかった。さらに検出感度を上げるため基質と BoNT の反応時間を 24 時間まで長くする検討も行ったが、反応時間が長くなるにつれて若干の検出感度増加は見られたものの、大きな改善は見られなかった。一方、マウス法の場合は、最終的な検出感度は 1 マウス LD_{50}/ml であるが、この結果が得られるのは、検体をマウスに接種した翌日以降である。数時間でマウスに症状が出現するのは、数十から数百マウス LD_{50}/ml 程度の BoNT が検体に含まれている場合である。今回構築した BoNT 検出法は、最終的な検出感度ではマウス法に及ばないが、100 マウス LD_{50}/ml 程度の BoNT が含まれる検体であれば、マウス法と同等な時間(数時間以内)で BoNT 検出が行えると考えられる。反応液の組成や基質濃度などにはまだ検討の余地が残っているので、今後、さらに感度を上げることが課題である。

検討中に一つ問題となったのは 71F 基質の安定性である。今回使用した精製 E

型 BoNT にはトリプシンが含まれていた。これは、E 型 BoNT は、トリプシンなどのプロテアーゼによってプロセッシングを受けると活性が増すため加えられているものである。このトリプシン活性によって、71F 基質が消化されてしまい、BoNT による特異的な切断産物が検出されにくくなった。しかし、この問題は反応液にプロテアーゼ阻害剤 (Thermo scientific 社の Halt™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free) を加えることによってトリプシンの活性が抑えられ E 型 BoNT の活性をうまく検出することができた。今後、実際の検体で今回構築した方法を試す場合も、反応液にプロテアーゼ阻害剤を加えるのは有効な方法だと考えられる。

今回作製した 71F 基質は C 型の BoNT で切断される部位も含んでいる (図 1)。71F は C 型 BoNT との反応でも切断がおこるはずであるが、現在、我々の研究室では、試験用の精製 C 型 BoNT を所持していないため、この検討は行わなかった。C 型 BoNT による切断点は、A 型による切断点と 1 アミノ酸しか変わらない。切断産物に大きな分子量差は生じないため、バイオアナライザーによる分析で A 型と C 型の毒素活性は区別できないと思われる。

今回、SNAP25 を含む基質タンパク質を作製したことによって A、C、E 型の BoNT 検出に対応できるシステムを構築した。しかし、バイオテロリズムでは A ~ G のどの型の BoNT でも使用される可能性があり、全ての毒素型に対応する必要がある。今回構築した方法を、B、D、

F、G 型の BoNT にも対応させるため、現在 synaptobrevin を含む組換え基質タンパク質の作製を進めている。

E. 結論

A、C、E 型の BoNT によって切断される SNAP25 を含む組換えタンパク質基質を作製し、この切断の有無を分析する事によって BoNT の存在を検出するシステムを構築した。このシステムでは 100 マウス LD₅₀/ml の精製 A または E 型の BoNT を 3 時間で検出できることを示した。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

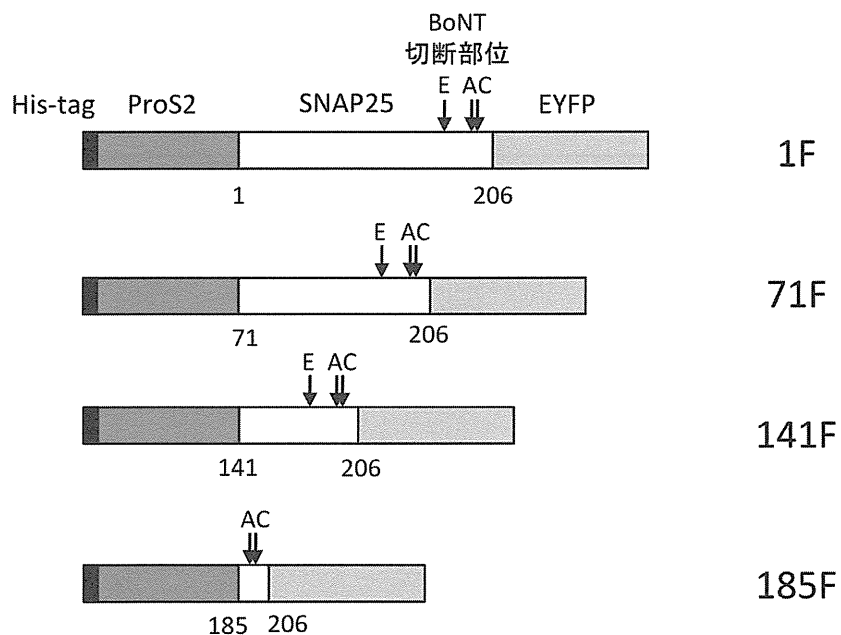


図1. BoNT エンドペプチダーゼ活性測定用基質タンパク質の作製

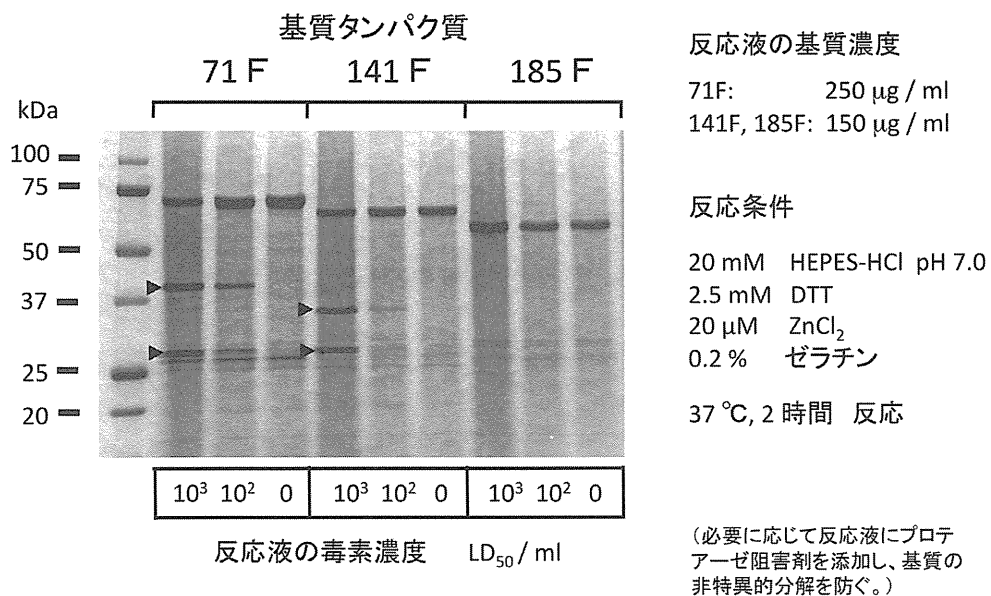
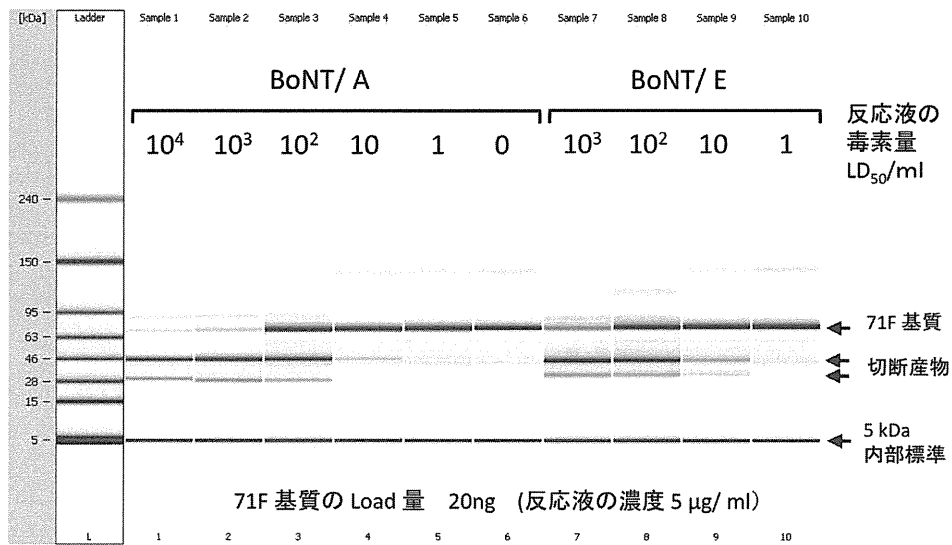


図2. A型 BoNT による基質タンパク質の切断実験



反応条件は、図2と同じ

図3. バイオアナライザーで検出した 71F 基質の BoNT による切断

厚生労働科学研究費 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
新規リケッチアのゲノム解析によるリケッチア同定法の検討

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 馬原アカリ医学研究所
研究協力者 黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
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
研究協力者 安藤 匡子 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、一部がセレクトエージェントに指定されている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ため、新規分離リケッチア株の全ゲノム解析をこころみ、既存のリケッチア種との比較を行うことにより、バイオテロを想定した場合の多様な臨床症状をも示すリケッチア症に対し、SNPs解析による迅速診断系の可能性について検討した。

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種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。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。輸入症例から分離された新規リケッチアの全ゲノム解析を行い、リケッチア症の多様性に関し、どのようにアプローチが可能か検討した。

B. 研究方法

1. 海外輸入例から得られた新規リケッチアの培養

急性期全血から得られた新規リケッチア株 *Rickettsia sp.* Tenjiku を L929 細胞で培養し、T75 培養ボトルの全量を解析のための周っぱウ材料とした。

2. リケッチアゲノムDNAの調整法

100% 感染した L929 細胞を培養上清とともに回収し、高速冷却遠心機により得たペレットを 5 mL の PBS (-) に再懸濁した。この菌液をダウンスホモジナイザーで 30 ストローク処理、低速遠心し、上清を回収後、その上清を再度高速冷却遠心してペレットとした。このペレットに市販の DNA 抽出キットの溶解液を

加え、プロトコールに従ってDNAを抽出した。

3. 分離リケッチアのゲノム解析

2で得られたゲノムDNAを次世代シーケンサー(イルミナ社マイシックMiSeq)を用いて250 bp paired-endで解析した。

(倫理面への配慮)

必要なし

C. 研究結果

新規リケッチアのゲノム解析

次世代シーケンサーによる解析の結果、総リード数で2,355,293 x 2リードが得られた。培養に用いたL929由来のリードを削除するためにbwaswによるマウスゲノムへのマッピングを行い、マウスゲノムにヒットするリードを削除した結果、240,559リード(5.4%)がリケッチア由来のもの候補として残った。さらに、CLC genome workbenchでアッセンブルしたところ、1 kb以上のものが21 contigs得られ、トータルで約1.34 Mbのゲノムサイズであることが推定された。

リケッチア独自のものと考えられた21 contigsをCGE(Center for Genomic Epidemiology) serverのsnpTree1.1によるゲノムワイドのSNPs系統解析を行い、紅斑熱群ならびに発疹チフス群を含む既報の23種のリケッチア種のゲノム情報と比較したところ、解析にもちいた新規リケッチアR. sp Tenjikuは明らかに他のリケッチア種と異なるものであった。(図1)

D. 考察

全ゲノム解析から試みたゲノムワイドのSNPs系統解析から、R. sp Tenjikuは、部分的に行っていたompA, gltA, 17 k-Da抗原, 16

S, geneDの各遺伝子と同様に、既知のリケッチア種と異なることが示された。今回もちいた21 contigsによるSNPs解析から既知のリケッチアと鑑別が可能であるが、より少ないcontigsでの解析により同様の鑑別が可能であるかの検討が必要である。さらにリケッチア症疑いの検体から直接シーケンス解析を行うことにより、SNPs解析からリケッチアの検出並びに鑑別が可能であるかの件等が必要である。

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。リケッチアが用いられたバイオテロを想定するためには、国内に常在するリケッチアであるか、既知のリケッチアであるかの鑑別できるかがテロの認知やリスク評価に重要となる。海外のみならず国内においても多様なリケッチアの存在があきらかになってきており、より簡便で迅速なリケッチアの鑑別のための標的SNPの検討が必要であり、その検出が臨床材料への適用が可能かさらに進める必要がある。

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、より簡便に検出し、迅速に鑑別するために、今回試みたゲノムワイドのSNPs解析の導入がよりおこないやすくするための環境整備が今後必要と考えられる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sashida H, Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Nagai K, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Harasawa R; Two Clusters among *Mycoplasma haemomuris* Strains, Defined by the 16S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer Sequences. *J Vet Med Sci.* (in press)

2) Gaowa, Ohashi N, Aochi M, Wuritu, Wu D, Yoshikawa Y, Kawamori F, Honda T, Fujita H, Takada N, Oikawa Y, Kawabata H, Ando S, Kishimoto T: *Rickettsia* in ticks, Japan, *Emerging Infectious Diseases*, 2013 Feb, 19(2): 338-340

3) Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K; Murine Typhus with Shock and Acute Respiratory Failure in a Japanese Traveler after Returning From Thailand. *J Travel Med*, 2013 Jan 20(1):50-3

4) 安藤秀二, ペストコントロール技術セミナー「怖いダニ類媒介性感染症～地域毎の情報を発信することが大事」, ペストコントロール, 2012年10月

5) 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, 2012年4月

2. 学会発表

1) Ando S, Ogasawara Y; Traveler's Rickettsioses and Domestic Rickettsioses in Japan In 2011, 15th International

Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

2) Takajoh I, Matsuda M, Kariya Y, Sakaguchi S, Kawaguchi T, Miyauchi S, Umekita K, Ueno S, Kusumoto N, Nagatomo Y, Ogasawara Y, Ando S, Okayama A; Novel spotted fever group rickettsiosis? In a Japanese traveler returned from India, 15th International Congress on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, June 13-16, 2012

3) 安藤秀二: マダニと感染症の話, ペストコントロール協会講習会講演, 2012年11月13日, 東京

4) 安藤秀二: リケッチア感染症について～つつが虫病, 日本紅斑熱を中心に, 輸入症例(海外のトピックス)を含めて, 平成24年度動物由来感染症技術研修会, 2012年11月2日, 東京

5) 岸田直樹, 安藤秀二, 久保光司; 北海道で初めての診断となった国内5例目となる African Tick Bite Fever の一例, 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2012年10月10日～12日, 東京

6) 原崎多代, 大屋賢司, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 黒田誠, 福士秀人; クラミジア肺炎およびオウム病を鑑別するマルチプレックスPCR法の開発. 第154回日本獣医学会, 平成24年9月14～16日, 盛岡

7) 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人; 動物クラミジアを検出するLAMP法の開発. 第154回日本獣医学科, 平成24年9月14～16日, 盛岡

8) 佐藤正明, 小川基彦, 安藤秀二; Chlamydia trachomatisのMLS解析に関する検討, 第30回日本クラミジア研究会, 平成24年9月8日, 東京

9) 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, 奥田秀子, 安藤秀二, 福士秀人; 動物クラミジアを検出するLAMP法の開発. 第30回日本クラミジア研究会, 平成24年9月8日, 東京

10) 藤澤智美, 藤田博己, 角坂照貴, 安藤秀二, 高野愛, 小笠原由美子, 川端寛樹, 清島真理子; Rickettsia africaeによる旅行者感染の一例, 第20回ダニと疾患のインターフェース, 平成24年7月6~8日, 徳島県阿南市

11) 安藤秀二, 山内悠子, 竹下望, 藤澤智美, 清島真理子, 堀田剛, 清水恒広, 高城一郎, 岡山昭彦, 阪本直也, 中村ふくみ, 大西健児; 実験室診断で経験した多様なリケッチア症, 第86回日本感染症学会, 平成24年4月25~26日, 長崎

12) 高城一郎, 金子裕美, 坂口翔太, 川口剛, 宮内俊一, 梅北邦彦, 上野史朗, 楠本規生, 長友安弘, 安藤秀二, 岡山昭彦; インドからの輸入感染症と考えられた新規リケッチア症の一例, 第86回日本感染症学会, 平成24年4月25~26日, 長崎

13) 中島隆弘, 清水恒広, 堀田剛, 安藤秀二; 南アフリカ滞在中に感染し来日後に発症した地中海紅斑熱のブラジル人症例, 第86回日本感染症学会, 平成24年4月25~26日, 長崎

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 |

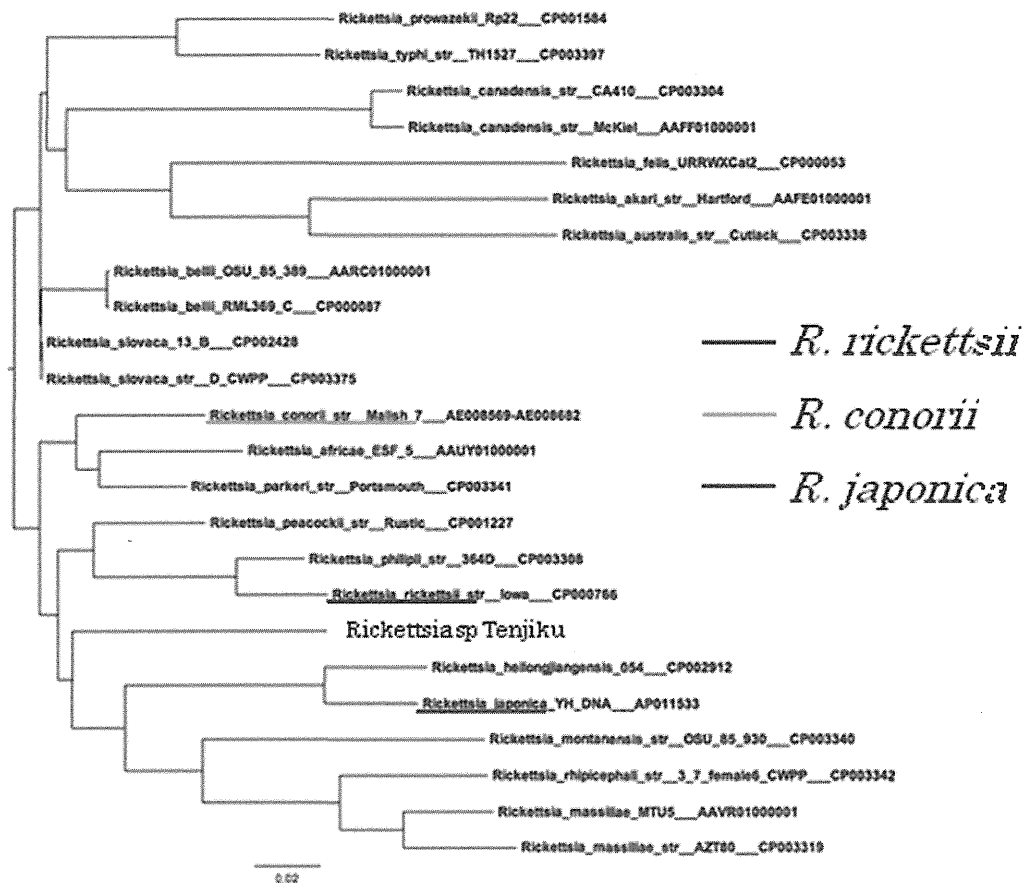


図1. SNPs系統樹(ゲノムワイド)

厚生労働科学研究費 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
realtime PCRによる *Histoplasma* および *Coccidioides* の高感度検出系の構築

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*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*) 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ズマなどの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、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、平板寒天培地にコクシジオイデスやヒストプラズマが発育した場合の検体処理方法を検討し、マルチプレックスリアルタイムPCRによるコクシジオイデスおよびヒストプラズマ DNA の検出系を確立した。

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のみで見られる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症などは健常者に起こることが知られており、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増してきた。

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*)、ヒストプラズマ (*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。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が、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海外の流行地への渡航歴のないヒストプラズマ、クリプトコックス・ガッティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。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は飛散胞子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全かつ簡便な診断系を構築し、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

今年度は以下の 2 点について検討を行った。

- ・平板培地で培養された BSL3 真菌の不活化と DNA 抽出方法
- ・Taqman probe および LUX primer を用いたヒストプラスマおよびコクシジオイデス DNA の検出法

平板培地で培養されたヒストプラスマおよびコクシジオイデスは大量の分生子（胞子を）産生し、わずかな振動や気流によって胞子を飛散させる。したがって気流が発生している安全キャビネット内で実験操作は多大な危険を伴う。そこで、安全キャビネット内に小型のグローブボックスを操作し平板培地で発育した菌を取り扱った。菌の不活化は 100%エタノールを用い、グローブボックスはホルマリン燻蒸によって消毒を行った。

ヒストプラスマ DNA については、M 抗原遺伝子および、100kDa タンパク質遺伝子の内部に Taqman probe を設計し、コクシジオイデス DNA については、Coi9 領域に LUX プライマーを設計し、それぞれ realtime PCR によって検出を試みた（表 1）。

Realtime PCR は 2step（95°C5 秒、60°C30 秒）を 40 サイクル行った。PCR 反応の特異性については形態の類似する複数の菌

種の DNA を用いて検証を行った。

表 1

名称	配列
<i>for Coccidioides</i>	
87FU	5'-CATCCAGAGAGCAAACATCCAAA-3'
i66RL	5'-CACTTTGCGGCTAGTCAACGAAAGT-FAM-G-3'
<i>for Histoplasma</i>	
MSP tqmn F	5'-AAGCCCTGGCCTGTTAAATTTT-3'
MSP tqmn R	5'-GGAAACGGACGACGAAAGT-3'
Hc tqmn F	5'-CGGTCATGTCTGGAACACAAA-3'
Hc tqmn R	5'-CGGATGACGGATGCGTAAC-3'
MSP Taqman	5'-VIC-CTCCTCCCGCCATTCTTTCC-TAMRA-3'
Hc Taqman	5'-VIC-ATTGCATTGGCCCTCGTGC-TAMRA-3'

（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) 平板培地で培養された BSL3 の不活化と DNA 抽出方法

小型のグローブボックスを安全キャビネット内に設置し、その中で実験操作を行った。プラスチックの使い捨て白金耳の先端を PBS (0.01% Tween 80) に浸し、寒天培地上で発育したコロニーから最小限の実験操作で胞子を釣菌し、斜面培地に接種し、30°Cでの分離培養を行った。

6-7 日後、斜面培地で発育した菌の不活化を行った。シリコン栓より注射針を用いて 70%エタノールを栓付近まで注入し、2 日間室温で放置した。その後、安全キャビネット内で斜面培地より菌体を剃刀で切除し DNA 抽出に供した。いずれの操作手順においてもグローブボックス内にはある程度胞子が飛散することが予想されたため、ボックス内でホルマリンの入った容器を開放し、燻蒸によって消毒を行った。

以上の実験手法は何度かシミュレート操作を行い検討を重ねたうえで現時点で

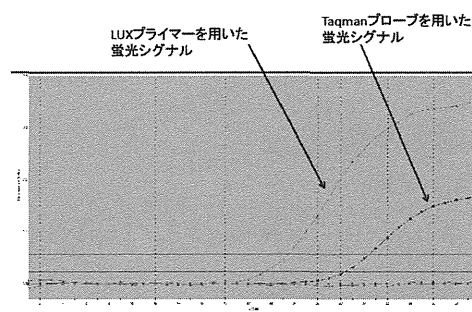
の最善の実験手法であると判断した。

2) Taqman probe および LUX プライマーによるヒストプラスマおよびコクシジオイデス DNA の検出

ヒストプラスマについて M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質遺伝子の適切な領域に Taqman probe (VIC-TAMRA) を設計し、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子に関してはこの実験系は機能しなかったが、100kDa タンパク質遺伝子については、1ng のゲノム DNA を検出することができた。

LUX プライマーによる realtime PCR も上記と同様の実験系で蛍光定量（蛍光色素：FAM）を行った。こちらの PCR についてはコクシジオイデスゲノム DNA の調製が完了しなかったため、当部で保存してあった濃度不明のコクシジオイデス DNA を用いて検証を行ったが、過去の報告通り LUX プライマーによる DNA の検出が可能であった。

上記、2 種類の realtime PCR は蛍光色素の検出波長が異なるために、混合して使用することが理論上可能である。二種類のプローブを混合して PCR を行ったが、双方の蛍光検出結果に互いに全く影響がないことを確認できた。また、白色の糸状菌であり、形態的にコクシジオイデスやヒストプラスマと判別が困難である、*Pseudallescheria boydii*、*Scedodporium commune*、*Penicillium griseofulvum* のゲノム DNA を用いて実験を行い、目的の菌以外のゲノム DNA では蛍光が検出されないことを確認することができた。



D. 考察

ヒストプラスマやコクシジオイデスがテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうかは予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

今回検討した培養された菌の取り扱い方法によって、いずれの検査施設でも安全に菌を分離培養することが可能となり、仮に感染者が増加した場合、各検査施設においても菌の取り扱い・同定が可能になるものと期待される。

また、本実験で確立した realtime PCR 実験系ではヒストプラスマかコクシジオイデスカを特異的かつ迅速簡便に同定することが可能である。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、臨床検体をもちいてこの realtime PCR が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後実験系の改良を進めていきたい。

E. 結論

胞子を飛散させやすい BSL3 真菌の取り扱い方法の検討を行った。

マルチプレックス Realtime PCR によるヒストプラスマとコクシジオイデスの迅速診断系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*. 30:3304-3310, 2012.
2. Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol*. 50:412-416, 2012.
3. Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. , 2012.
4. Miyazaki H, Kobayashi R, Ishikawa H, Awano N, Yamagoe S, Miyazaki Y, Matsumoto T. Activation of COL1A2 promoter in human fibroblasts by *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 65:481-487, 2012.
5. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol*. 50:631-636, 2012.
6. Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. A first report of *Rothia aeria* endocarditis complicated by cerebral hemorrhage. *Intern Med*. 51:3295-3299, 2012.
7. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol*. , 2012.
8. Tarumoto N, Kinjo Y, Ueno K, Okawara A, Watarai H, Taniguchi M, Maesaki S, Miyazaki Y. A limited role for iNKT cells in controlling systemic *Candida albicans* infection. *Jpn J Infect Dis*. 65:522-526, 2012.

和文論文

1. 宮崎義継, 河野 茂. 特集: 真菌と免疫・アレルギー 3. アスペルギルス属と免疫・アレルギー. *アレルギーの臨床*. 32:615-618, 2012.
2. 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. *感染症*. 42:172-175, 2012.

3. 宮崎義継, 大野秀明. 特集 感染症医薬品開発の現況 真菌症に関する診断法の現状と展望. 最新医学. 67:2566-2571, 2012.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
4. Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Ohno H, Miyazaki Y. Fungicidal effectiveness against biofilms of *Candida albicans*. 6th ASM conference of biofilms. September 29-October 4, 2012, Miami, USA.

国内学会

1. 金子幸弘, 小畑陽子, 西野友哉, 掛屋 弘, 瀬藤光利, 宮崎義継, 古巢朗, 河野 茂. 質量顕微鏡による IgA 腎症モデルの病態解析. 第 109 回日本内科学会. 4 月 13-15 日, 2012 年, 京都.
2. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 新規抗真菌併用薬の探索. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
3. 大野秀明, 田辺公一, 杉田 隆, 畠山修司, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 渋谷和俊, 亀井克彦, 宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
4. 渋谷和俊, 大久保陽一郎, 大野秀明, 宮崎義継, 田辺公一, 金子幸弘, 山越 智, 梅山 隆, 安藤常浩, 若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
5. 泉川公一, 三原 智, 森永芳智, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋 弘, 山本善裕, 柳原克紀, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. 長崎大学病院における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing を用いた分子疫学調査. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 4 月 20-22 日, 2012 年, 神戸.
6. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子

- 幸弘, 大野秀明, 宮崎義継.
Aspergillus fumigatus 分泌蛋白質 B-11 の病原性の解析とサント・イツチ ELISA 系の構築. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
7. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. マウスモデルにおける自然免疫の活性化によるカンジダ症増悪の免疫学的解析. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
 8. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 知花博治, 宮崎義継. *Candida* 臨床分離株におけるミカファンギン感受性と FKS 遺伝子の解析. 第 60 回日本化学療法学会学術集会. 4 月 26-27 日, 2012 年, 長崎.
 9. 名木 稔, 田辺公一, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
 10. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.
 11. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御. 第 60 回日本化学療法学会学術集会. 4 月 26-27 日, 2012 年, 長崎.
 12. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の肺胞上皮細胞への接着と侵入機構. 第 33 回関東医真菌懇話会学術集会. 5 月 26 日, 2012 年, 東京.
 13. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎 稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT 細胞の活性化によるカンジダ症増悪機序の免疫学的解析〜マウスモデルを用いた解析〜. 第 33 回関東医真菌懇話会. 5 月 26 日, 2012 年, 東京.
 14. 樽本憲人, 金城雄樹, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎 稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT 細胞の活性化によるマウスカンジダ症増悪機序の解析. 第 23 回日本生体防御学会. 7 月 9-11 日, 2012 年, 東京.
 15. 宮崎義継, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 田辺公一, 山越 智, 大野秀明. シンポジウム 2 症例から考える真菌症: 診断・治療の難しさ、感染症としての面白さ 4) 接合菌症を疑うときに何をするか. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 16. 金城雄樹, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダ細胞壁マンナンの構造と炎症性サイトカイン誘導の関係. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12

- 日, 2012年, 東京.
17. 宮崎義継. 気管支鏡検査 (TBLB および BAL) にて診断された肺コクシジオイデス症の一例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 18. 宮崎義継, 梅山 隆, 田辺公一, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明. 教育講演-4 肺真菌症をいかに診断するか. 第 49 回日本臨床生理学会総会. 10 月 18-19 日, 2012 年, 長崎.
 19. 田辺公一, 名木 稔, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会/第 95 回日本細菌学会関東支部総会. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 20. 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構. 第 41 回薬剤耐性菌研究会. 10 月 25-26 日, 2012 年, 下呂.
 21. 宮崎義継. 侵襲性真菌症への対応について. 平成 24 年度医師卒後臨床研修. 10 月 23 日, 2012 年, 東京.
 22. 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. COX 阻害剤による *Candida albicans* の抗真菌薬感受性変化と排出ポンプ発現誘導. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 23. 木村雅友, 大野秀明, 梅山 隆, 宮崎義継. アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の 2 手術例. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 24. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコッカス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 25. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子: 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 26. 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* の細胞壁、分泌蛋白質 B-11 の機能解析. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 27. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子: 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.
 28. 宮坂智充, 青柳哲史, 内山美寧, 國島広之, 賀来満夫, 石井恵子, 中山俊憲, 植村靖史, 大石和徳, 金城雄樹, 宮崎義継, 川上和義. 23 価肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生における NKT 細胞の役割に関する臨床免疫学

- 的検討. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会. 11 月 17-18 日, 2012 年, 横浜.
29. 宮坂智充, 外山真彦, 赤堀ゆきこ, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 中山俊憲, 岩倉洋一郎, 西城 忍, 大石和徳, 川上和義. 23 価肺炎球菌多糖体ワクチンによる血清型特異的 IgG 産生における NKT 細胞と Dectin-2 の役割. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会. 11 月 17-18 日, 2012 年, 横浜.
30. 宮崎義継. 真菌症について. 平成 24 年度動物由来感染症対策技術研究会. 11 月 2 日, 2012 年, 東京.
31. 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 山越智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み. 第 35 回日本分子生物学会年会. 12 月 11-14 日, 2012 年, 福岡.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)
- 特許取得
特記事項なし
実用新案登録
特記事項なし
その他
特記事項なし

厚生労働科学研究費 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

鼻疽・類鼻疽の迅速診断法に関する研究

研究分担者 国立感染症研究所・細菌第二部・堀野敦子

協力研究者 川崎医科大学・公衆衛生学 山根一和

研究要旨

鼻疽(glanders)、類鼻疽(melioidosis)は *Burkholderia* 属の細菌、*Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* がそれぞれ感染して起きる感染症である。日本国内では類鼻疽は稀な感染症であり、鼻疽はさらに稀な感染症で戦後ヒトでの発生例は報告が無い。しかし、国外では両者にはかなり違いが認められる。類鼻疽菌、*B. pseudomallei* は東南アジア、北部オーストラリアなどでは土壤中に常在菌として生存しており、農耕期やモンスーンの時期に類鼻疽の患者発生が多い。感染経路は創傷からの経皮感染、吸入感染、また経口摂取である。発病する患者は基礎疾患を持っていることが多い。多くは糖尿病、腎臓障害、過度のアルコール摂取である。類鼻疽流行地域では類鼻疽は稀な疾患ではない。タイの流行地域では類鼻疽流行期に市中肺炎患者が医療機関を受診した場合には、まず類鼻疽が疑われる。

一方、鼻疽は国外でも非常に稀な疾患である。ウマでまれに散发例が見られるがヒトへの感染例はほとんど報告されていない。近年ではアメリカで実験室感染と考えられる例が報告されているのみである。また、原因菌である *B. mallei* は *B. pseudomallei* とは異なり環境中では生存できない。この菌は主にウマ、ロバに感染する。ヒトには患畜の膿などから感染するとされる。

これらの *B. pseudomallei*, *B. mallei* は CDC のカテゴリ-B に指定されておりバイオテロに使用される懸念のある細菌である。このため、日本国内で事例が発生したときのために検出法を確立しておく必要がある。本研究では地方衛生研究所等で検査が可能であるように、普及している検査法での確立をめざし、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法を選択した。*B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法は前年度までに基礎検討が終了していたが、二つの系の反応条件が異なっておりこれらを揃える方が望まし

いため、両者が問題なく反応できる温度、反応液量を検討した。結果として *B. pseudomallei* の LAMP 法の反応温度を上げ、反応系の液量を調整したことで対応が可能であった。LAMP 法の感度ならびに特異度には問題はなかった。現在、この *B. pseudomallei* の LAMP 法は検査時に参考データとして使用するために実施しているが、既報よりも感度がよく、判定もクリアである。また、*B. mallei* の LAMP 法はこれまで報告がないため、迅速簡便な検査法として利用できると考えられる。

今年度は LAMP 法の検討の他に抗原検出法による同定法のひとつとして国立感染症研究所・病理部より分与された *B. pseudomallei* と *B. mallei* に対するモノクローナル抗体の性能評価を行った。

A. 研究目的

本分担研究では、バイオテロに使用される懸念のある *Burkholderia* 属の細菌、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の迅速検出法を確立することを目的としている。これまで、*B. pseudomallei* と *B. mallei* の迅速検出法について検討を行ってきた。迅速検出法として簡便な遺伝子検出法であり地方衛生研究所などで比較的普及している LAMP 法を選択し、昨年度までに基礎検討を終えている。今年度はキットとして使用しやすい形態にするべく *B. pseudomallei* と *B. mallei* の反応条件を揃えることを目標とし、添付プロトコール作成も行い、要請時には分与可能な状態とすることを旨とした。

また、菌の同定法の一つとして国立感染症研究所・病理部より分与された *B. pseudomallei* と *B. mallei* に対するモノクローナル抗体の評価を行うことも今年度の目的とした。

B. 研究方法

1. *B. pseudomallei* の迅速遺伝子検出法

(LAMP 法)

現在使用している LAMP 法のプライマー群は *B. pseudomallei* のべん毛関連遺伝子 BPSS0122 を標的遺伝子としている。これまで *B. pseudomallei* の LAMP 法は反応条件 63°C、60 分にて行ってきた。しかし *B. mallei* と反応条件を揃える方が使用しやすいため、後述する *B. mallei* の LAMP 法の反応温度 67°C、60 分で反応を試みることにした。また、反応液量も現行の LAMP 法と異なっていたため、現行の試薬量でこれまでと同等の結果が得られるのか検討を行うことにした。

2. *B. mallei* の迅速遺伝子検出法 (LAMP 法)

LAMP 法の標的遺伝子を BMAA0749 (hemagglutinin domain-containing protein) として設計したプライマー群のうち、2 群のプライマー、ID_93 と ID_102 について条件検討を行った。これらのプライマー群は *B. mallei*、LAMP 法のコントロールとして用いている *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の 3 株には反応し