

検体中の夾雑物の影響を除去する手段の
開発が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

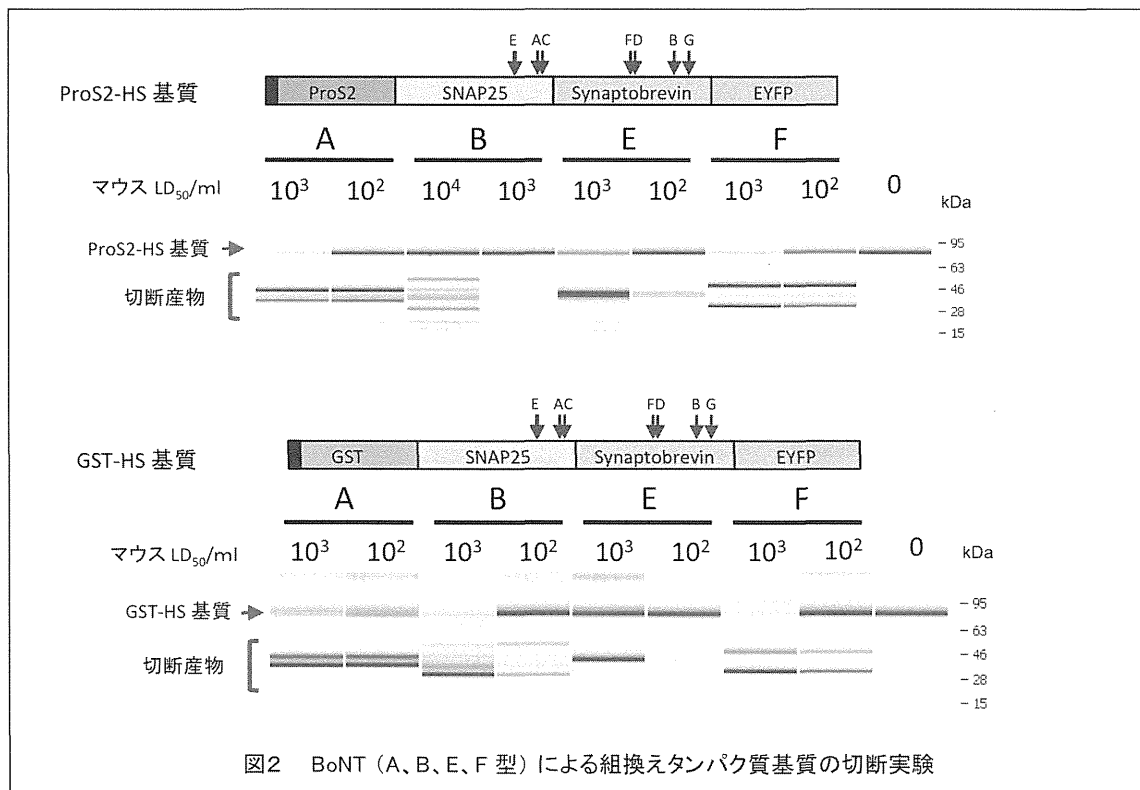
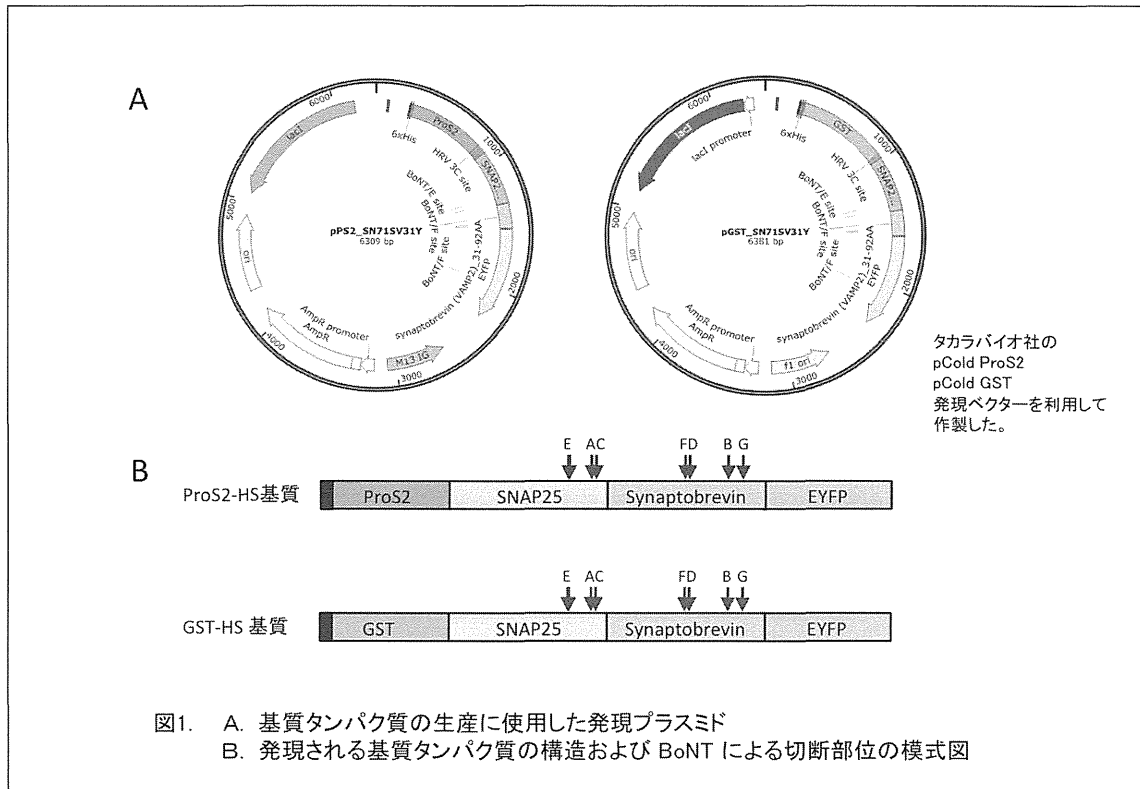
なし

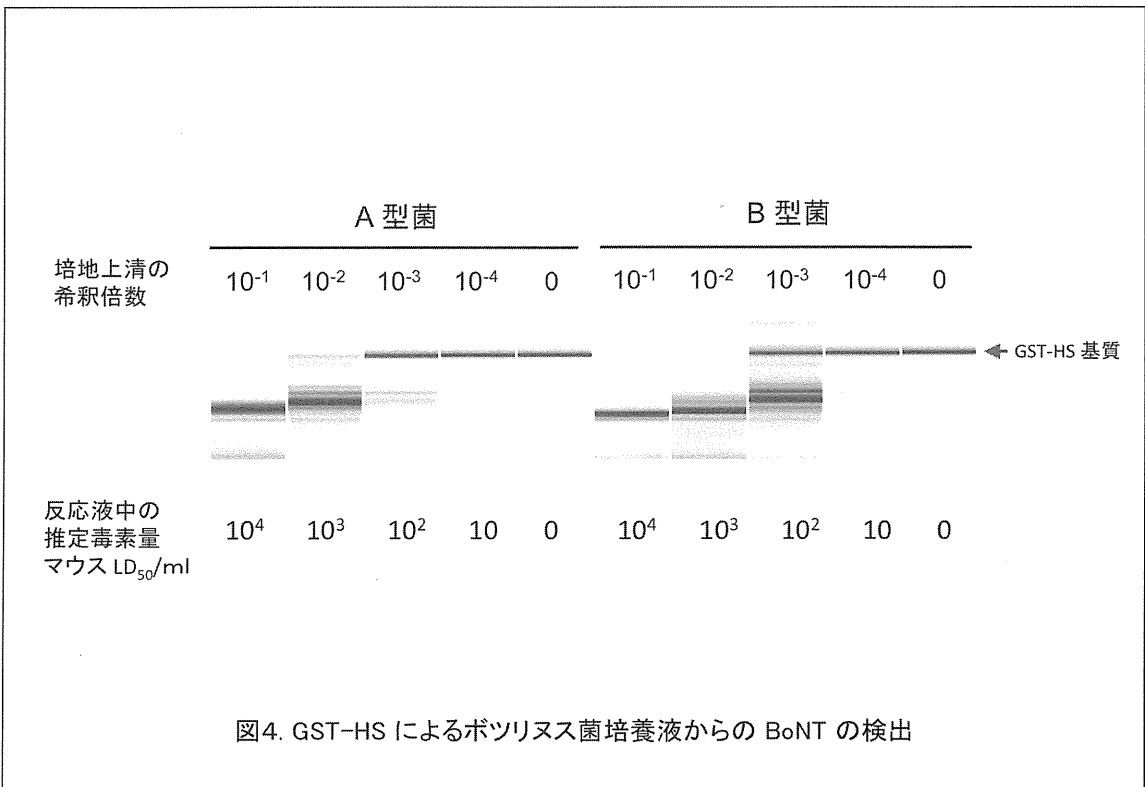
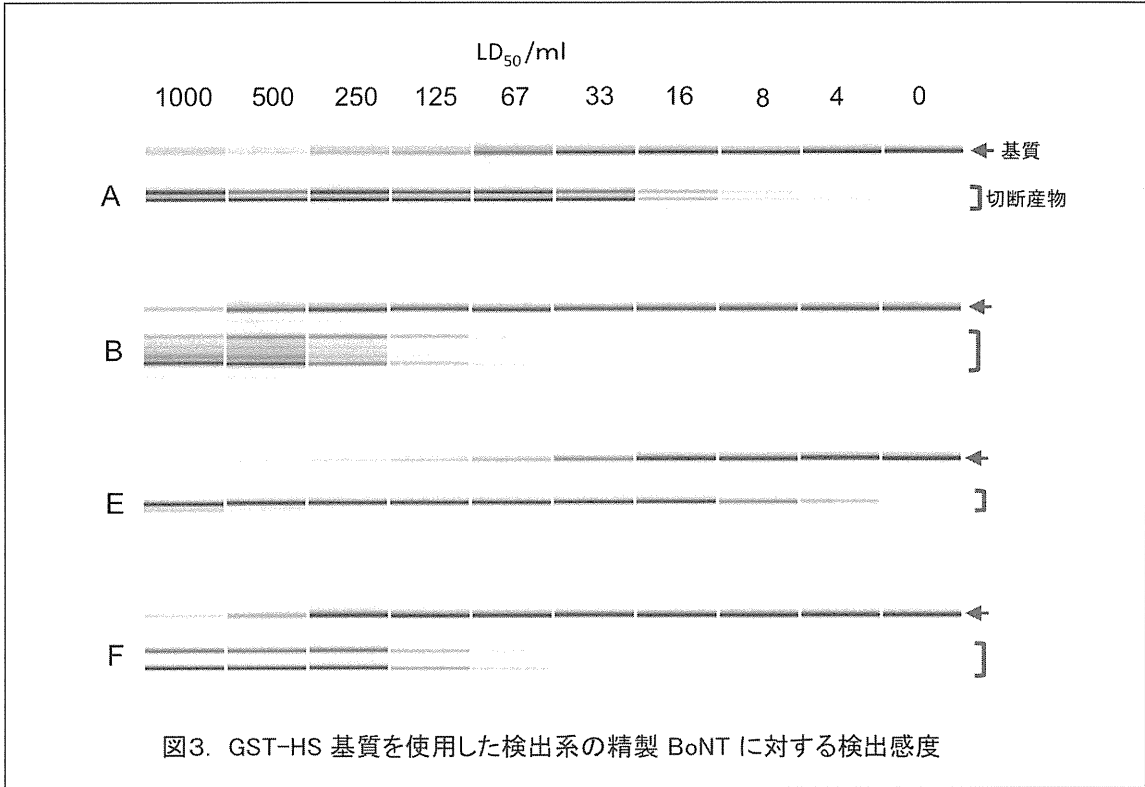
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む）

なし





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・コクシエラ・クラミジアの迅速検出法の開発
Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)のゲノム解析による基盤情報の整備

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	関塚 剛史	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	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	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	安藤 匡子	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	小川 基彦	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究協力者	佐藤 正明	国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：従来リケッチアに分類されていた*Coxiella burnetii*は、バイオテロに使用される可能性のあるとして、常にその取扱いに注意が必要と議論される病原体である。国内で分離された株、国内の実験室に保存されていた*C. burnetii*の分子生物学的特徴を把握することは、通常の感染でないバイオテロが発生した際に、迅速にその事態を明らかにする情報となる。Prototypeの*C. burnetii* Nine Mile株の実験室における継代でLPS抗原の変化で病原性が低下したII相菌と日本で初めて確認された患者から分離されたTK-1株について、次世代シーケンサーによって全ゲノム配列を解析するとともに、公開登録されている*C. burnetii* Nine Mile株の病原性の強いI相菌のゲノム情報と比較検討したところ、SNP s 解析による株の分類、同一株であるか否かの判別に利用可能と考えられる複数の遺伝子領域を確認できた。

A. 研究目的

Q熱病原体*Coxiella burnetii*は、微生物学的には現在レジオネラ目に属する偏性寄生細菌であるが、歴史的に長い間、リケッチアに分類されていた。バイオテロ・エージェントとして世界的に注目され、しばしばバイオテロに使用することが企まれた経緯がある。国内での自然発生患者は少ないものの、ひとたび発生すれば、多くの偶蹄類家畜の淘汰やヒトへの感染拡大など社会的影響も大きい。国内で分離された株、国内の実験室に保存さ

れる*C. burnetii*の分子生物学的特徴を把握することは、通常の感染でないバイオテロが発生した際に迅速にその事態を明らかにする基礎情報となる。前年度、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が、株の特性を把握するために極めて有効なツールであること示されたことに続き、Q熱病原体*C. burnetii*での全ゲノム解析の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. *C. burnetii*株と解析DNAの調整

国内で保管されていた*C. burnetii* Nine Mile株(prototype) II相菌(in vitro継代によりLPSの相変異を起こし、病原性が減弱したもの)(以下NM-NIID)と実験室感染を除く自然発症の本邦第一例目の患者から分離されたTK-1株をBGM細胞で培養し、T25培養ボトル1本の感染細胞を解析のための出発材料とした。ほぼ100%感染した細胞を培養上清とともに回収、高速冷却遠心機により得たペレットを1mL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。このペレットから定法によりDNAを抽出した。

2. ゲノム解析

得られたゲノムDNAを次世代シーケンサー(イルミナ社マイシクMiSeq)を用いて解読し、レファレンス・シーケンス(*Macaca mulatta*)の配列に解読リードをマッピング、unmap readをCLC genome workbenchで*de novo*アセンブルしたところ、1 kb以上(x1000以上のcoverage)のcontigを回収した。表1に示す全ゲノム情報が公表されている*C. burnetii*株とSNPs系統樹解析を行うとともに、今回解析した2株とprototype Nine Mile I相菌(RSA493)の比較解析を行った。

3. 海外のアウトブレイクに関する情報解析

2007年から2010年にかけて、オランダにおいて、多数の偶蹄類動物の淘汰を必要とする患者数千人規模の大アウトブレイクが発生した。その後、その発生に関する詳しい解析と多くの情報が発表されており、その情報を解析することにより、日本でのQ熱の発生形態の想定とバイオテロを感知するためのファ

クターの検討を試みた。

(倫理面への配慮)

必要なし

C. 研究結果

1. *C. burnetii*のゲノム解析

次世代シーケンサーによる解析の結果、*C. burnetii* NM-NIIDおよびTK-1ともにコクシエラのゲノムサイズと同等のアセンブルが問題なく可能であった(表2)。これらの情報を登録されているNine Mile I相菌(RSA493)の完全長のゲノム配列に沿ってcontigを並び替え、比較解析を行ったところ、SNPs系統樹解析では、比較解析した3つの*C. burnetii*のゲノムは極めて近いクラスターに収束したが、同じ由来とされるNM-NIIDとI相菌(RSA493)では、112の塩基置換があり、II相菌においてはpQpH1が欠落していた。TK-1は、国内で初めて自然発症者から分離された菌株であるが、Nine-Mile株と近縁であるものの、Nine-Mile株II相菌(NM-NIID)とは塩基置換数が225箇所存在した(図1、表3)。全長で見ると、3つのゲノム配列は高度に保存されているものの(図2)、NM-NIIDでは複数の核酸代謝系の領域が欠失していたり(図3)、さらにTK-1株ではpseudogene領域の変異と欠失、prophage領域の変異も見られた。

2. アウトブレイク情報からの国内の社会的影響等の検討と解析

オランダのアウトブレイクで見えてきたQ熱の集団発生の特徴は以下のとおりである。
①患者発生の前兆として山羊の流産が多発。
②動物や動物製品にかかわった患者が多い。
(ただし、Q熱の感染源として一般的な偶蹄類等に限らない。)

- ③職業的特徴はなし。
- ④流産が多発した農場からの距離。
- ⑤周辺環境の影響。
- ⑥マダニは関与していない。
- ⑦一度汚染された農場の清浄化は困難。(芽胞様構造)

D. 考察

今年度は、前年度のリケッチアにおける全ゲノム解析の有効性を踏まえ、国内で保管されている*C. burnetii*株のゲノム解読を行った。粗精製で培養細胞の共雑物が混ざっていても、*C. burnetii*の解析は十分可能であり、国内保存株の特徴を見だし、バイオテロに於ける迅速な株特定の基盤の作成が可能であることが示された。

国内保存株Nine-Mile II相菌(NM-NIID)は、国外の同一由来株とは異なる変異箇所が存在し、実際にバイオテロが発生した場合に於ける、国内保存株との差違を明確に出来ると示唆された。また、国内初の分離株TK-1は、NM-NIIDと非常に近縁であった。Nine Mile株が米国のマダニから分離されている経緯からも、TK-1株を分離した患者は国内に土着した*C. burnetii*による事例である可能性は低い。実際に、患者の渡航歴から、カナダでの偶蹄類家畜との接触がり、そこでの感染であった事が疫学データからも示唆されていたが、帰国から約2カ月経過しての発症であったため、エピソードとしては強く疑われるものの、国内での感染も明確に否定できないものであった。今回の解析結果から、やはりカナダでの感染を強く疑うものであったことが言える。

三者間の比較では、核酸代謝系の遺伝子の欠失および変異が認められ、*C. burnetii*は、偏性細胞内寄生細菌のため、核酸代謝系を欠

失しても生存は可能である事も本データから示唆される。複数の領域において、株間に変異や欠失も認められた。また一方、病原性関連領域と報告されているT4SSは、三者間で高度に保存されていた。病原性における表現系の僅かな差異は、今回認められた変異箇所によると示唆される。

以上のことから、*C. burnetii*に関し、国内保存株のゲノムワイドな情報を蓄積することにより、バイオテロの可能性を見極めることができる可能性が示された。

また、様々な疫学情報を蓄積することにより、自然な発生か否かを判断するためには、日本国内の畜産形態を含めた総合的な情報収集が必要であることが明らかであった。

E. 結論

*C. burnetii*によるQ熱は臨床的には他の熱性疾患等との鑑別が難しく、バイオテロが想定される患者発生があった際は、国内に常在または実験室保管株であるか、海外の株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。国内外の情報を蓄積することにより、より簡便で迅速な対応を可能とすることが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiyama T, Kaneshima T, Takano A, Haya shidani H, Ando S: Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in

Japan. J Vet Med Sci, 2013 August, 75 (8):1115-1117

2) Ogawa M, Uchiyama T, Satoh M, Ando S: Decontamination of mycoplasma-contaminated *Orientia tsutsugamushi* strains by repeating passages through cell cultures with antibiotics, BMC Microbiol., 13:32-, 2013

3) 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. 2013 May, 75(5):643-648

4) 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12版,

2014(in press)

2. 学会発表

1) 安藤秀二, 佐藤正明, 小川基彦: 発疹熱輸入症例の現況, 第20回リケッチア研究会, 2014年1月12日, 滋賀県大津市

2) 藤田博己, 藤田信子, 安藤秀二: 国内における発疹熱リケッチアの潜在について, 第20回リケッチア研究会, 2014年1月12日, 滋賀県大津市

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 |

表1 *Coxiella burnetii*のゲノム解析状況 (PATRIC)

GI ID	Strain	Origin	Disease	Status	Size	
82552	Nine Mile Phase I, RSA493	Montana, Tick, 1935	unknown	complete	1,995,281 bp	TIGR
33747	Henzerling, RSA331	Italy, human blood, 1945	Acute	complete	2,016,427 bp	TIGR
32972	Dugway, 5J108-111	Utah, Rodents blood, 1958	unknown	complete	2,158,758 bp	JGraigVenter Inst
77120	K Q154	Oregon, Human heart valve, 1976	Endocarditis	complete	2,063,100 bp	RMLab /Integrated Genomics, Inc
10955	G Q212	Nova Scotia, Human heart valve, 1981	Endocarditis	complete	2,008,870 bp	RMLab /Integrated Genomics, Inc
107188	MSU Goat Q177	Montana, Goat cotyledon, 1980	(Abortion)	WGS		TIGR
129292	Q321, RSA334	Central Africa, Human blood, 1949	Acute	WGS		TIGR
243852	cb109	Germany, human cardiac valve		WGS		URMITE

表2 *de novo*アッセンブルの結果

	Number of contigs	N50 (bp)	N90 (bp)	Max (bp)	total (bp)
Nine-Mile II NIID	42	99,504	25,343	230,631	1,945,990
TK-I NIID	67	58,046	18,039	198,250	1,956,580

表3 三者間のSNP数

	Nine-Mile NIID	TK-I NIID
RSA 493	112	209
Nine-Mile NIID		225

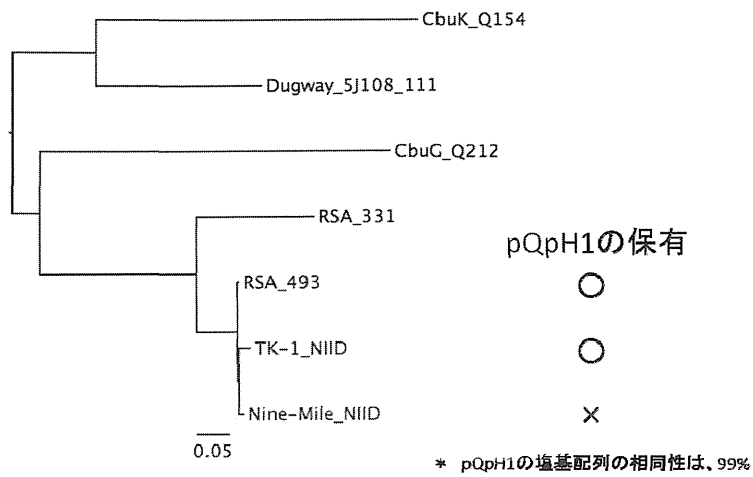


図1 SNPs 系統解析
Coxiella burnetii CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出
 Total SNPs: 10,947 SNPs

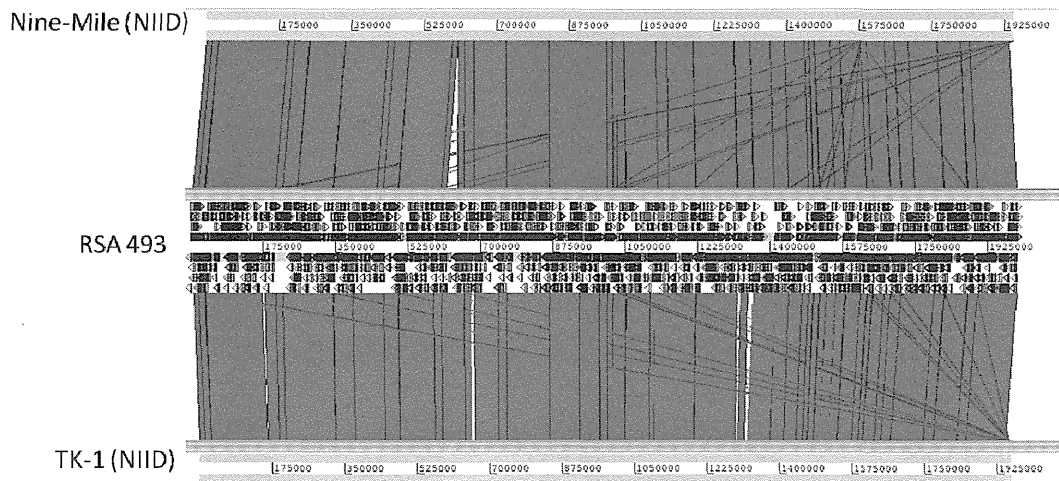


図2 ゲノム比較解析

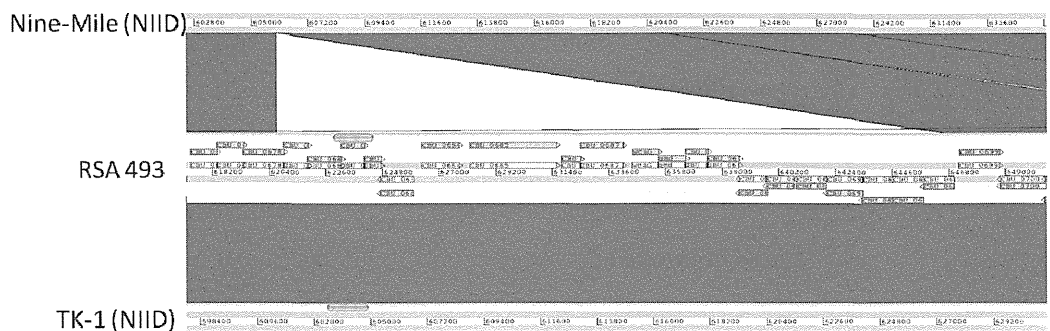


図3 ゲノム比較解析 ~Nine-Mile_NIIDで欠失していた箇所~

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
Coccidioides の LAMP 法による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 真菌部
研究協力者 梅山 隆 国立感染症研究所 真菌部第一室

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*, *C. posadasii*)、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 検出法を開発し、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つことを目的とした。今年度は、LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラズマ DNA の高感度検出系を確立した。

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み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*) 等が想定される。いずれの真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、コクシジオイデス属、ヒストプラズマ属については、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孢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つことを目的とする。今年度は、コクシジオイデス属およびヒストプラスマ属の簡便かつ高感度な検査法の開発として、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の検討を行った。

B. 研究方法

コクシジオイデス検出のための LAMP 法の標的配列として、以前開発したコクシジオイデス特異的 PCR の標的である *Coi9-1* 領域を用いた。ヒストプラスマの標的配列として、M 抗原遺伝子を用いた。4 種類の LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) を利用して数組設計した。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キットおよび検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200 μ l PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63°C で反応を行った。検討に用いた *C. immitis*、*Coccidioides posadasii* および *H. capsulatum* の DNA は臨床分離株から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 のゲノム DNA を用いた。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

(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) コクシジオイデス属 LAMP 法の開発

まず、3 組の LAMP プライマーセット A, B, C を設計し、10 ng の *C. immitis* および *C. posadasii* のゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った (図 1)。

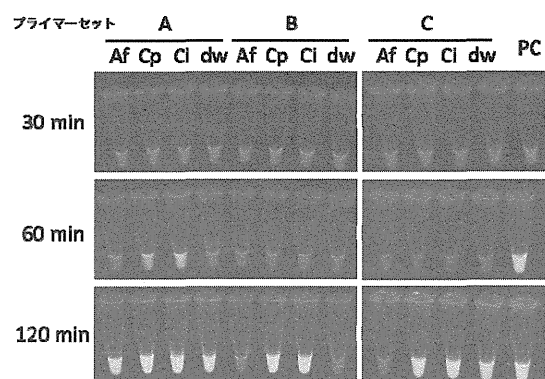


図 1. コクシジオイデス属 LAMP プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

プライマーセット A では、1 時間で検出できたが、2 時間では陰性コントロールでも偽陽性として検出された。プライマーセット B では 1 時間では検出できなかったが、2 時間後に陽性サンプルのみ検出できた。プライマーセット C では、1 時間では検出できず、2 時間後で検出された。水だけの陰性コントロールにおいて検出されているが、アスペルギルス DNA の陰性コントロールでは検出されていないことから、注意して操作したにもかかわらず、微量の DNA のコンタミが原因と考えられる。

次に、プライマーセット B および C について検出感度を上げるために、loop プライマーの検討を行った。それぞれのプライマーセットについて 2 組ずつ loop プライマーを設計し (B-L1, B-L2, C-L1, C-L2)、LAMP 反応を行った (図 2)。

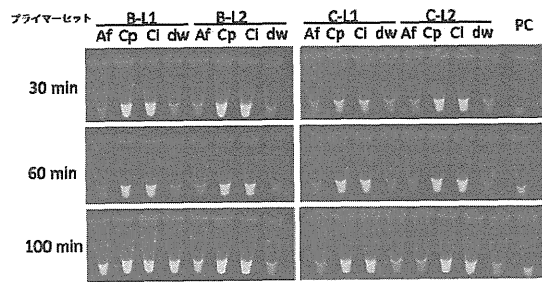


図 2. コクシジオイデス属 loop プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

全ての LAMP-loop プライマーの組み合わせについて 30 分で検出可能であった。B-L1 および B-L2 では 100 分後に陰性コントロールでも検出されてしまったことから、C-L1 および C-L2 プライマーセットが今回検討した中で最適なものであるとして、今後の検討に用いることにした。

次に、検出限界の検討を行った。C. *posadasii* のゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、C-L1 および C-L2 プライマーセットを用いて LAMP 反応を行った。ゲノムサイズを 30 Mb で換算すると、どちらのプライマーセットでも 100 fg、30 コピーまで検出が可能であった。

2) ヒストプラスマ属 LAMP 法の開発

上記の戦略に従って、M 抗原遺伝子を標的としたヒストプラスマ DNA に対する LAMP 法の開発を行った。4 組の LAMP-loop プライマーセットを設計し、そのうち 1 組だけが、5 種類の臨床分離 *H. capsulatum* DNA を検出することが出来た (図 3)。

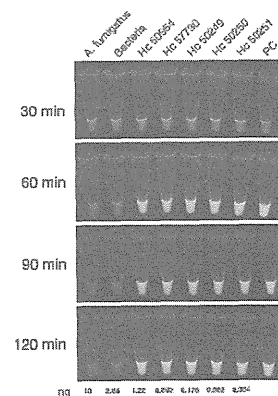


図 3 ヒストプラスマ属 LAMP 法の検討
PC: キット添付の陽性コントロール

D. 考察

ヒストプラスマ属やコクシジオイデス属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。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が強く、検査実施機関によって結果が異なることも多い。LAMP 法は反応系は非常に簡素で、反応温度が定温であるため、サーマルサイクラーの性能に依存しないという利点がある。しかも、1 時間で微量 DNA を検出することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればコクシジオイデスおよびヒストプラスマを迅速簡便に検出できる。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、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、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

LAMP 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラスマ属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. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. Jpn J Infect Dis. 2013, 66(1):51-5.
2. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. Med Mycol. 51:252-260, 2013.
3. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis. 66:216-221, 2013.
4. Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko

Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. Mediators Inflamm. 2013:465319, 2013.

5. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother. 19:999-1003, 2013.

和文論文

1. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278, 2013.
2. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.
3. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断. 臨床神経学. 53:1191-1193, 2013.

学会発表

国際学会

1. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

国内学会

1. 大野秀明, 宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断- (シンポジウム). 第 54 回日本神経学会学術大会. 5 月 29-6 月 1 日, 2013 年, 東京.
2. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. パネルディスカッション 病原体サーベイランスの現状と課題「国立感染症研究所の立場から」. 衛生微生物技術協議会第 34 回研究会. 7 月 11-12 日, 2013 年, 名古屋.
3. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 名木 稔, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013

年, 東京.

4. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.

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

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

研究協力者 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。ウマでまれに散発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 のカテゴリー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迅速な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、普及している核酸検出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た。今年度は、実際の検査時にこの *B. pseudomallei* の LAMP 法を既報の検出法に加えて実施し、性能の比較検討を行った。結果として既報の検査法

と判定結果は同じであった。また、我々の LAMP 法は既報の LAMP 法よりも感度がよく、判定もクリアであった。今年度は *B. mallei* の検査依頼が無かったため検査での性能検討は行っていないが、過去の保存検体を用いた検討では過去の判定と同じ判定結果が得られた。*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。

この検査の過程で、国立感染症研究所・細菌第二部に検体を送る前に各機関で行われた自動検査機器による *Burkholderia* 属の誤同定が問題となった。特に *B. pseudomallei* と *B. cepacia* との誤同定が問題となってきているのでこれについてまとめた。また、類鼻疽の血清学的検出法について検討中である。

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。これまでこれらの迅速検出法について核酸検出法を用いた検討を行ってきた。迅速検出法としては簡便な核酸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、昨年度まで基礎検討を終えている。今年度は実際の検査時に、既報の方法に加えて我々の LAMP 法を使用し、実用性の確認ならびに性能の比較検討を行うこととした。

また、類鼻疽については、患者血清中の抗体から類鼻疽を診断・同定する方法も求められているが、現在のところ方法がない。このため、今年度は同定法の一つとして類鼻疽の血清学的検出の検討を開始した。

B. pseudomallei, *B. mallei* の検査を行った結果、国立感染症研究所・細菌第二部に検体が搬入される前の初回検査が自動

検査機器で行われた場合、誤判定が見受けられた。検出を行うにあたり問題と考えられたため、これらの誤判定例についてまとめることとした。

B. 研究方法

1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

現在使用している *B. pseudomallei* の 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。*B. mallei* の迅速遺伝子検出法では LAMP 法の標的遺伝子を BMAA0749 (hemagglutinin domain-containing protein) としている。これらの LAMP 法の反応条件は、いずれも反応温度 67°C、反応時間 60 分である。陽性の場合反応開始 30 分程度で濁度の観察ができ判定が行える。この方法を既報の LAMP 法 (Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2008. P568-573. Chantratita N. et al.)、Multiplex PCR 法 (Journal of Clinical Microbiology, 2011. P814-821. Vol.49,

No.3, Ho et al.), 培養法と併用して検査で使用し結果を比較した。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

B. pseudomallei, *B. mallei*, *B. thailandensis* と *B. cepacia* の菌体を不活化し SDS-PAGE を行い、類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、*B. thailandensis*, *B. cepacia* ならびに *B. pseudomallei* の外膜タンパク質の分画を行った。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤判定について

B. pseudomallei 検査の結果、検体提出元において感染研へ検体を搬入する根拠となった自動検査機器結果による誤判定が見うけられたため *B. mallei* を含めた過去の検査結果について検討を行った。

(倫理面への配慮)

今年度は倫理面で倫理委員会に申請する必要があるヒトの臨床検体を用いた実験研究はおこなっていない。

C. 研究結果

1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速核酸検出法 (LAMP 法)

今年度は *B. pseudomallei* の同定依頼検査を 4 件行った。検体はいずれも臨床分離株であった。検査は培養法、既報の LAMP 法、Multiplex PCR 法、今回の LAMP 法の 4 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* と同定されたものは 3 件であった。同定された検体は培養法、二種類の LAMP 法、Multiplex PCR 法いずれの方法でも *B. pseudomallei* 陽性であった。ま

た、*B. pseudomallei* が否定された検体では、培養法でも *B. pseudomallei* 陰性であり、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* 陰性であった。

B. pseudomallei 陽性検体 3 件について LAMP 法の比較を行ったところ我々の方法は既報の LAMP 法よりも結果がでるまでの時間が 30 分以上早く、濁度の判定もクリアであった。

2. 類鼻疽の血清学的検出法の検討

類鼻疽の原因菌 *B. pseudomallei* に加えて、ヒトから検出される可能性のある類縁菌の *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* の whole cell lysate を SDS-PAGE にて泳動し、類鼻疽の患者血清でウェスタンブロッティングを行った。その結果、各菌体の多くのタンパク質に反応してしまい *B. pseudomallei* 特異的な反応を見ることができなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画し、これらについて類鼻疽患者血清を用いてウェスタンブロッティングを行う予定であった。現在までのところ、それぞれの菌の外膜タンパクの分画まで作業が進んだがウェスタンブロッティングには至っていない。

3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

これまでに *B. pseudomallei* が疑われた臨床分離株の検体 2 件が検査の結果、*B. cepacia* と同定された。これらの検体は病院や検査機関における初回の検査時に自動検査機器を用いて *B. pseudomallei* の疑いと判定されている。国立感染症研究所

でこれまでに *B. pseudomallei* と *B. mallei* の検査は 14 件行っているが、*B. mallei* と判定されて検査を行った 2 件は *Burkholderia* 属以外の細菌と同定されている。これらの検体も初回の検査では自動検査機器を用いて判定されており、自動検査機器を用いて *Burkholderia* 属と判定された場合には注意が必要であることが明らかになった。

D. 考察

B. pseudomallei, *B. mallei* の LAMP 法の検討として、今年度は実際に検査をおこなう際に既報の手法に加えて、我々の LAMP 法を併用して行い性能を比較した。今年度は、*B. pseudomallei* が疑われる 4 件の検査を行った。送付された検体はいずれも臨床分離株で、3 件は *B. pseudomallei* と同定され 1 件は否定された。用いた方法のあいだで判定に違いはなかった。二種類の LAMP 法の比較では我々の LAMP 法が判定までの時間も早く判定も明確であり、既報よりも検査に適していると考えられた。今後は可能であれば、検査時に臨床分離株に加えて尿検体、血液検体も同時に検査を行い、性能の評価を行いたい。

今年度は *B. mallei* の検査依頼は無かった。過去に *B. mallei* の検査依頼があり、結果として *B. mallei* は否定されている。その保管臨床分離株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの株は *B. mallei* 陰性と判定された。日本国内ではバイオテロなどの有事の際以外では、通常

B. mallei が患者から分離されることは考えにくいため、今後は *B. mallei* 検査依頼時の陰性判定の際の参考結果としても使用していく予定である。また、有事の際の検出法として使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、医療機関よりサンプルが類鼻疽疑い患者血清しかない場合などに問い合わせがある。現在国内で検出可能な方法がないため検出法の開発を試みているが、現在までのところまだ検出可能な状況に至っていない。日本国内では類鼻疽流行国と異なり、不顕性感染などで血清中の抗体価が陽性である人口が多いという問題を考える必要がほぼ無いため、手法が確立できれば有用なツールになり得るので継続して検討を行いたい。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は国外でも問題になっており、自動検査機器だけではなくコマースシャルシステムによる検出法で *B. pseudomallei* と *B. cepacia* を同定する際の誤同定の多さが指摘されている (Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 59 (2007),277-281)。我々の経験例とは逆に *B. pseudomallei* の感染者が実は *B. cepacia* に感染していたと誤同定された例も報告されている (Journal of Medical Microbiology(2012),61, 1483-1484)。類鼻疽は迅速な投薬開始が求められる感染症であるだけに重要な問題であろうと考えられる。テロなどの有事の際にもこのような事例が生ずる可能性も

あるため、なんらかの方法で周知ができればと考える。今年度はヒト由来検体のみならず、ネコ由来検体が自動検査機器で *B. pseudomallei* と判定され我々で検査を行った事例もあり、この例でも結果は *B. cepacia* であった。また、自動検査機器では *B. pseudomallei* と *B. cepacia* の誤同定の問題だけではなく、*B. mallei* と他の菌との誤同定例も経験していることから *Burkholderia* 属の検査結果には注意が必要である。同定のゴールドスタンダードである培養法を併用するのが望ましいが、*B. pseudomallei*, *B. mallei* の培養を経験していない場合では判定が難しい可能性も考えられるので、LAMP 法などの核酸検出法を併用するのがより望ましいと考える。

E. 結論

有事の際のバイオテロ対策が必要な *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法に LAMP 法を適用することとし、検討を行ってきた。今年度はこれらの LAMP 法を実際の検査で既報の検査法と併用して性能の比較を行った。その結果、我々の *B. pseudomallei* の LAMP 法は既報の方法と判定結果が一致しており、既報の LAMP 法より 30 分早く検出が可能であった。また、*B. mallei* の検査依頼が無かったため実際の検査での性能比較は行えなかったが、過去の検体を用いた検査では同じ判定を得た。

類鼻疽の血清学的検出法は今後の検討課題として残った。

Burkholderia 属の自動検査機器による誤同定の問題は今後留意すべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ベトナムから帰国後空洞病変で発症し、再燃時多発肺結節を認めたメリオイドシスの 1 例、倉田季代子、貫井義久、島田裕之、井上幸久、吉村信行、堀野敦子、日本呼吸器学会雑誌、Vol. 49, No. 6, 443-448、2011

2) Young Japanese women after traveling to Southeast Asia; Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. Intern Med. 2010; 49 (5): 491-5.

2. 学会発表

LAMP 法による *Burkholderia pseudomallei* と *Burkholderia mallei* の検出、堀野敦子、山根一和、柴山恵吾、阿戸 学、日本細菌学会第 86 回総会、2013 年 3 月、千葉県

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

分担研究課題： 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と包括的な核酸迅速診断法の確立

研究分担者	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 センター長
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	竹内史比古	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室
	山下明史	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

研究要旨

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。その危険性に対する確な対処法を立案・整備する上で、バイオテロ病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確なアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサー（Next-generation DNA sequencer: NGS）のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている。

次世代型網羅的病原体検査法の骨格が既に構築済みであり、国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで検査可能であるが、バイオテロ発生（および疑い事例を含む）において現場対応が迅速であればあるほど有効な対応策だと考えている。感染研・ゲノムセンターでは現場（病院・地方衛生研究所等）でも情報解析できるよう、ネットワーク経由で病原体鑑別するための情報解析パイプライン（Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC）を開発し Web 情報解析サービスを開始した。情報解析を習熟していない検査技師であっても簡単な講習会により利用できるよう利便性を考えて作成している。また、バイオテロ病原体の臨床分離株のゲノム情報を活用し、ゲノムワイドな SNPs 検索と分子系統樹作成も可能にするシステム Global core-Genome SNPs Analysis (GcoGSA)を開発し、現在、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) のみ Web 解析サービスを開始した（関係者のみの運用予定）。順次、他カテゴリーA 病原体であるペスト菌、野兔病菌、コクシエラ、類鼻疽菌、ボツリヌス菌のゲノム情報を用いた GcoGSA を展開していく予定である。

将来的に日常の微生物検査で NGS が汎用される日が来るであろう。その際、予見しえなかった症例から NGS – MePIC – MEGAN パイプラインでカテゴリーA 病原体を検出した場合、引き続き GcoGSA にてゲノム分子疫学解析を行い、バイオテロ病原体（もしくは孤発例）の由来を推定するトレーサビリティ・追跡への情報提供になり、有事における迅速なバイオテロ対策へと貢献できると考える。

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されて

いる。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった。最先端の革新技術を応用し、効率的かつ安定的に病原体検査