

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 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株の病原性の強い相菌のゲノム情報と比較検討したところ、SNPs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) 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,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 相菌(NM-NIID)とは塩基置換数が225箇所存在した(図1,表3)。全長でみると,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。

患者発生の前兆として山羊の流産が多発。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。)

職業的特徴はなし。

流産が多発した農場からの距離。

周辺環境の影響。

マダニは関与していない。

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 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T4SSI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	JGraig Venter Inst
77120	K Q154	Oregon, Human heart valve, 1976	Endocarditis	complete	2,063,100 bp	RM Lab /Integrated Genomics, Inc
10955	G Q212	Nova Scotia, Human heart valve, 1981	Endocarditis	complete	2,008,870 bp	RM Lab /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*アッセムブルの結果

	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-1 NIID	67	58,046	18,039	198,250	1,956,580

表3 三者間のSNP数

	Nine-Mile NIID	TK-1 NIID
RSA 493	112	209
Nine-Mile NIID		225

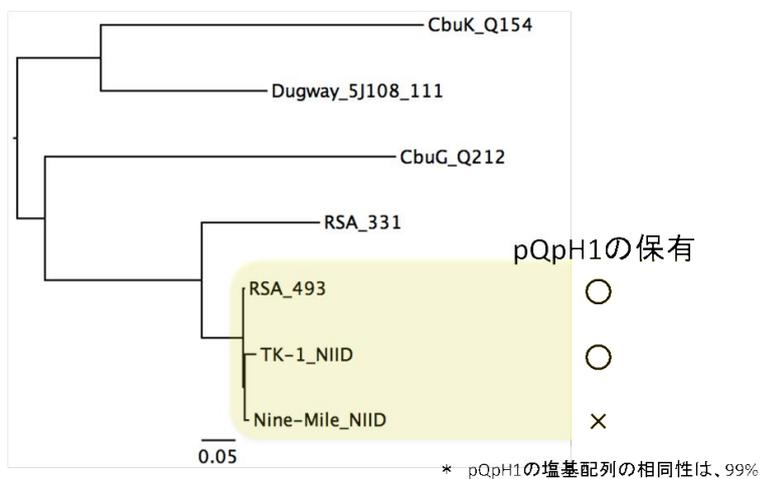


図1 SNPs 系統解析
Coxiella burnetii CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出
 Total SNPs: 10,947 SNPs

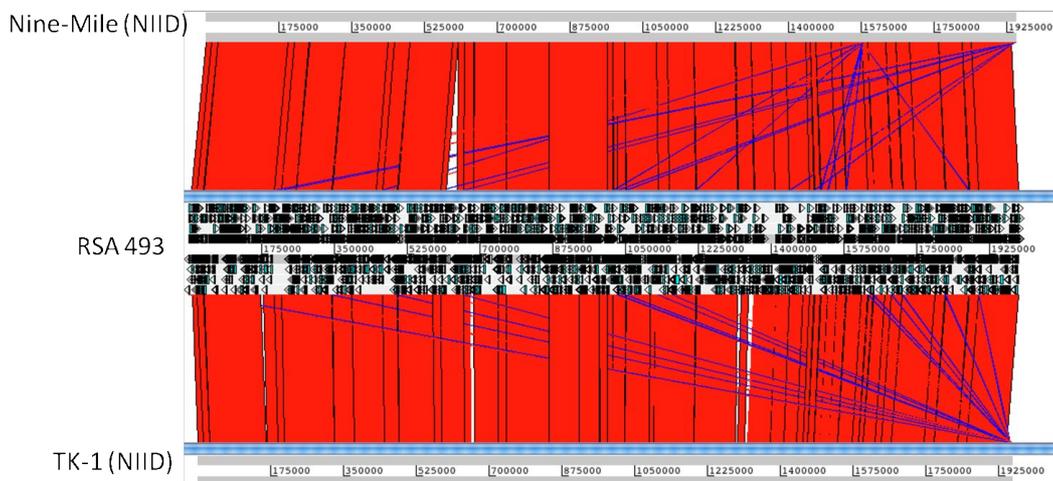


図2 ゲノム比較解析

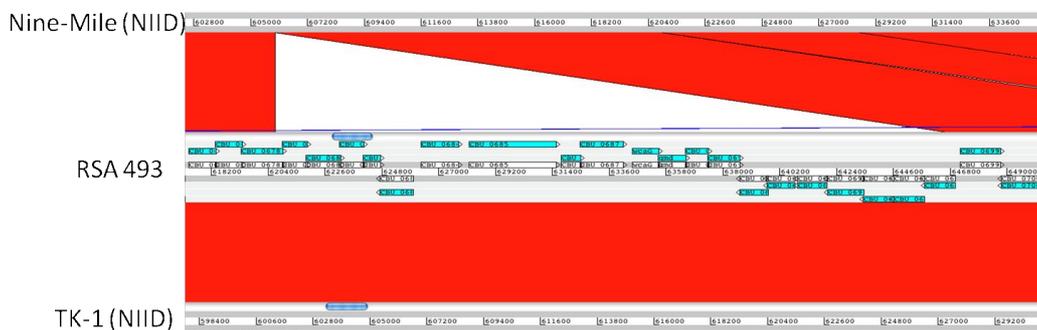


図3 ゲノム比較解析 ~Nine-Mile_NIIDで欠失していた箇所~