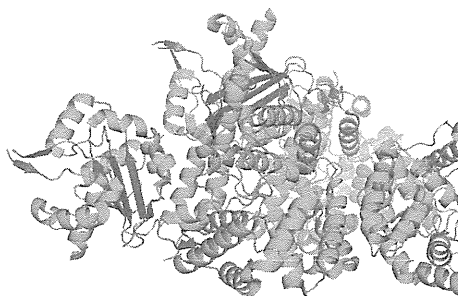
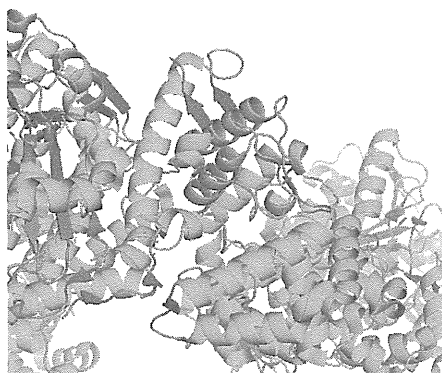


図 3-1 ラッサウイルス NP の $_{297}$ PGERNPYENILYKIC $_{311}$ ペプチドの位置 (緑色)



(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図 3-2 ラッサウイルス NP の $_{311}$ CLSGDGWPYIASRT $_{324}$ ペプチドの位置 (緑色)



(PyMol View of Lassa NP structure; 3MWP.pdb)

図 4 アレナウイルス高度保存領域ペプチド抗体による ELISA

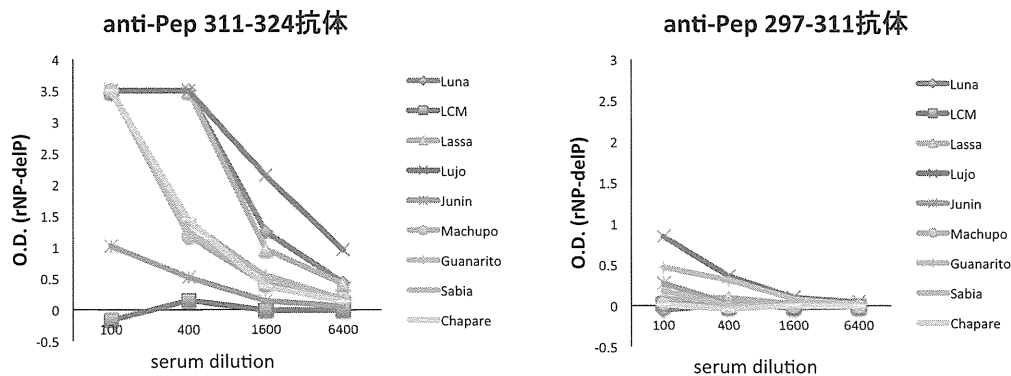


図5 ELISAによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

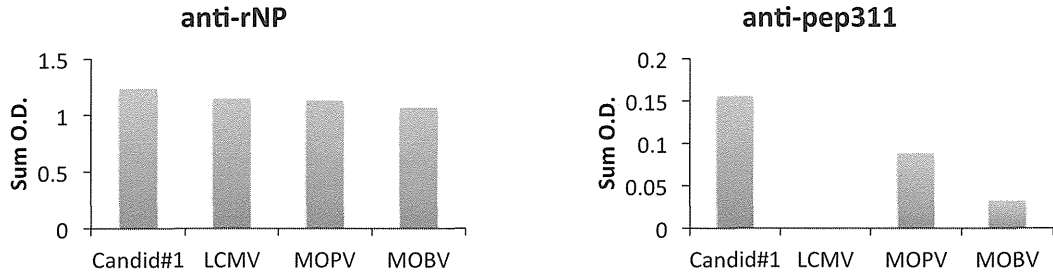


図6 ウェスタンブロッティングによるペプチド抗体の authentic ウイルス抗原との反応

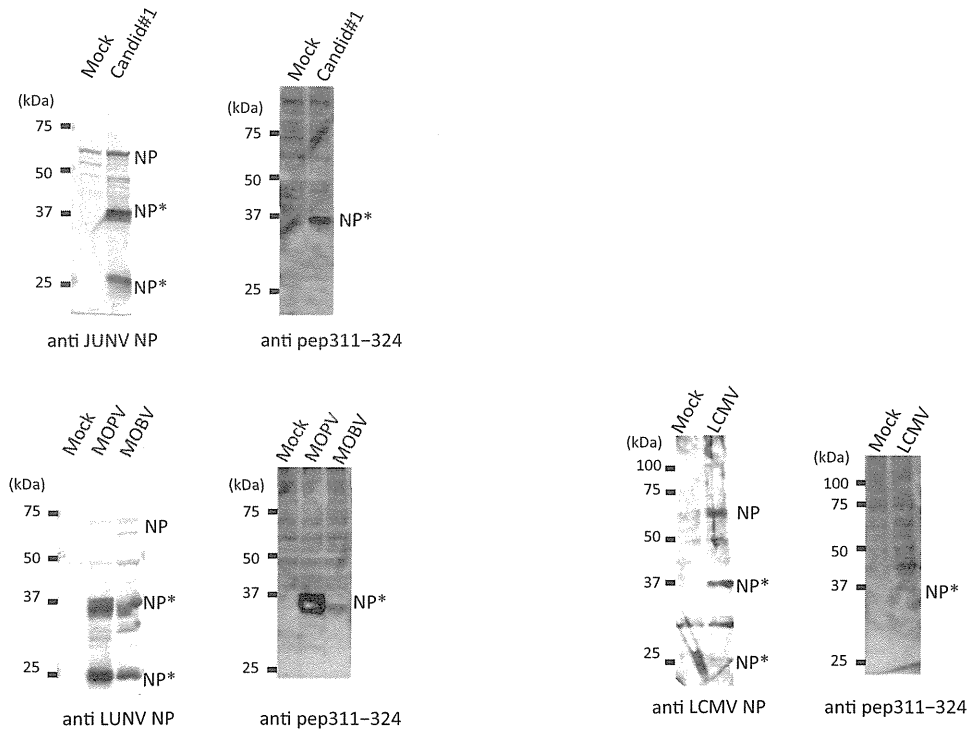


図7 アレナウイルスのGP-2で保存されている領域

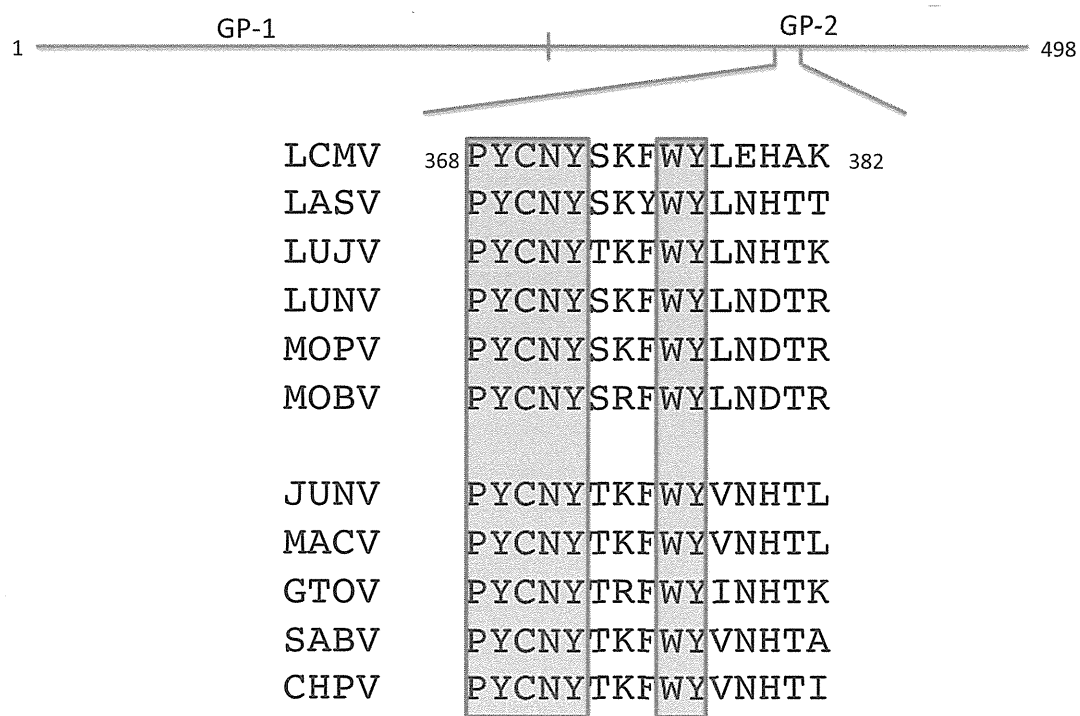
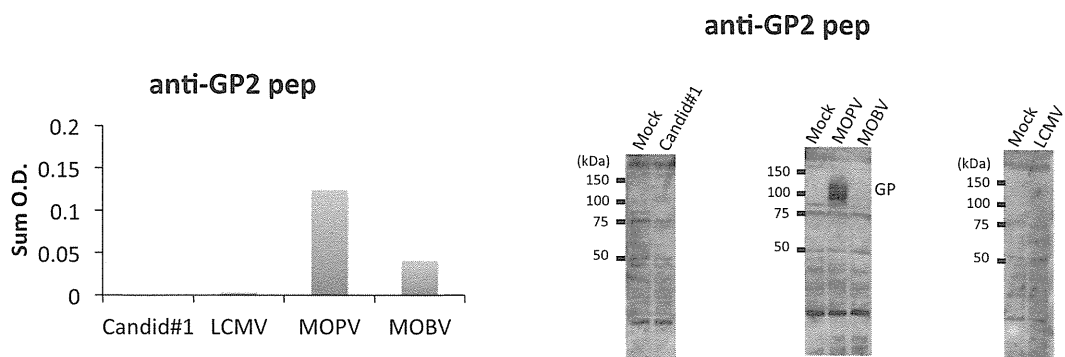


図8 アレナウイルスのGP-2ペプチド抗体を用いたELISA（左図）およびウエスタンブロッティング（右図）



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

人獣共通感染症（炭疽、狂犬病等）に対するヒト検体および感染源検体を用いた
迅速検査、消毒、その標準化等に関する研究

研究分担者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
研究協力者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
：黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、センター長
：関塚剛史 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター、主任研究官

研究要旨：

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。平成 23 年度：モンゴルで分離された炭疽菌株に特異的な 12 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を特定して 12SNP タイピング法を確立した。平成 24 年度：National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) の協力を得て動物および環境由来のモンゴル分離株を 14 株追加して確立した 12SNP タイピングについて追加検討を行いモンゴル株は大きく 4 つのクラスターに分かれ、それぞれに地域特性のあることが示された。平成 25 年度：生物テロで利用される可能性のある炭疽菌の治療薬は抗生剤が使用可能であるが、人為的な薬剤耐性菌の出現に対する備えのため、新たな作用機序をもつ抗菌物質の探索を行い、Anti Microbial Peptides (抗菌性ペプチド) である豚由来の Protegrin-1 が高い抗菌効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

近年わが国で発生がないものの、バイオテロに使用される可能性のある炭疽や狂犬病等の動物由来感染症では、希少発生事例（輸入感染症等）に対する迅速な原因病原体の証明と侵入経路等の特定が公衆衛生上の大きな課題である。国内外の専門家と連携してバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の患者・感染源動物等について、迅速な検査、消毒および標準化を進めることにより、わが国での公衆衛生行政における危機管理対応を容易にすることが本研究の目的である。

そこで、本研究では炭疽の発生と流行が問題となっているモンゴル National Center for Infectious Disease with Natural Foci (NCIDNF) との共同研究により、アジアで分離される炭疽菌株の遺伝学的タイピングシステムの開発を行い、我々の確立した SNP 解析方法を応用して分離株を菌株レベルで識別できる SNP タイピングシステムの確立を試みた。また、これまで炭疽治療に使用されてきた抗生物質は効果が高く、これまでにペニシリン系以外の薬剤耐性菌の出現は報告されていないが、炭疽菌は生物兵器として使用された歴史があり、今後人為的に薬剤

耐性が付加されたもの使用される可能性は否定できない。そのため、既存の抗菌剤ではない新たな治療薬の探索として従来の抗菌剤や化学物質とは異なる抗菌物質として食品由来の抗菌物質であるカテキン類、フラノン類および生体由来・短鎖抗菌性ペプチド (AMP) の抗菌効果について新たな抗菌活性物質としての可能性について検討を行った。

B. 研究方法

1. MLVA8 解析

モンゴル国内で分離された土壌由来と動物由来の炭疽菌 29 株を使用した。

炭疽菌染色体上の 6 箇所および病原性プラスミド pX01 および pX02 上の各 1 箇所の併せて 8 箇所の繰り返し配列領域について特異的プライマーによる PCR を行い、ダイレクトシーケンシング (ABI 3730 xl DNA Analyzer) により塩基配列を解読した。

塩基配列より各繰り返し配列の繰り返し数を算出し、アジア地域を始めとして欧米やアフリカ由来のデータと併せて、PHYLIP version 3.6 と Tree View version 1.6.6. を用いて、unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) method による系統解析を行った。

2. SNP 解析

2-1.

モンゴル株 29 株を用いて、我々が先に構築した、日本国内分離株を菌株レベルに識別可能な 80 箇所の SNP (80

tag-SNP) による系統解析を行った。

80 箇所の SNP は ABI 3730 xl DNA Analyzer により解読・特定して、モンゴル株に特異的な 80 SNP ライブラリーを作成した後に、MEGA version 5 を用いて Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株についてフルゲノム解析を行った。

遺伝子バンクに登録されている 21 株の公開フルゲノムデータと今回モンゴル株から得たゲノムデータを比較して、染色体上、病原性プラスミド pX01 および pX02 上の全 SNP を検索した。

また、検索した全 SNP から、モンゴル分離株に特異的な SNP パターンを抽出して、代表的な SNP (tag-SNP) を選択した後に、MEGA version 5 を使用して Neighbour-Joining Tree method で系統解析を行った。

3. 短鎖抗菌性ペプチド AMP の検討

炭疽菌の「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞への抗菌効果を検証を行った。AMP はその立体構造から α -helix 型、 β -sheet 型、Extended 型に大別される。また、炭疽抵抗性あるいは炭疽感受性動物由来のペプチドが各種同定されているため、全てを網羅するようペプチドを選択して人工合成を行った。炭疽菌への抗菌効果は RDA (Radial Diffusion Assay) アッセイで阻止円が形成された最少濃度を

MEC (Minimum Effective Concentration) 値として測定した。「芽胞」と「栄養型」の比較には 34F2 株 (pX01+, pX02-) を用いた。「芽胞」は一晩 37°C 好気培養した LB 培地を 4°C で 1 週間保存したものを冷 MilliQ で洗浄後回収し芽胞染色で一視野あたり 70% 以上芽胞が認められたものを用いた。一方、「莢膜」発現の有無の比較には Davis 株 (pX01-, pX02+) を用いた。莢膜は、0.7% 炭酸水素ナトリウム溶液を添加した Nutrient Agar を嫌気培養して発現させた。コントロールには Nutrient Agar のみで好気培養したものを用いた。

C. 研究結果

1. MLVA8 解析

モンゴル分離株 29 株は全て A3 クラスタに分類された。A3 クラスタは日本を始めとしたアジア諸国で分離される炭疽菌が多く分類されるクラスタである。しかしながら、MLVA8 による系統解析ではモンゴル分離株が形成するクラスタは同じブランチからの枝分かれから形成されており、菌株レベルでの識別は不可能であった。

2. SNP 解析

2-1.

MLVA8 よりも解析力の高い 80 tag-SNP を用いてモンゴル分離株の系統解析を行った (図 2)。モンゴル分離株は、日本分離株や Ames 株と同じ A3b クラスタに分類された。また、A3b クラスタ内で大きく 3 つのブランチを形成した。

80 tag-SNP は、MLVA8 解析より詳細な分類が可能であるが、日本分離株に特異的な 80 tag-SNP ではモンゴル分離株を菌株レベルで識別することは困難であった。

2-2.

モンゴル株 29 株から、モンゴルでの分離地域と土壌・動物由来株を網羅する 10 株のうち、7 株についてフルゲノムデータを得ることができた。モンゴル分離株に特異的な 148 箇所の SNP を抽出して、各 SNP パターンから代表的な SNP を 12 箇所に絞り込んだ。この 12 箇所の SNP を利用して系統樹を作成したところ、菌株レベルでの識別が可能となった。

3.

RDA アッセイの結果、「芽胞」「栄養型」および「莢膜型」細胞に対して、AMP の構造および由来動物の違いにより抗菌効果に差がみられ、豚由来の Protegrin-1 は「栄養型」よりも「芽胞」で MEC 値が低かった。それ以外の AMP では「芽胞」と「栄養型」と同等の MEC 値 (牛由来、羊由来、ヒト由来 AMP) を示すものと「芽胞」の方が MEC 値が 2 倍から 4 倍以上高いもの (犬由来および Protegrin-1 以外の豚由来 AMP) があった。

D. 結論

SNP を用いた遺伝学的タイピングによって、モンゴル分離株を菌株レベルで識別できることを明らかにした。分

離菌株のフルゲノム解析によってモンゴル株に特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を抽出して系統解析を行うと、A3b クラスタ内には分類されたモンゴル分離株を 3 つの大きなブランチに系統分類可能となった。

フルゲノム解析で分離菌株に特異的な SNP を特定すると、遺伝的変異が少ない炭疽菌についても、希少発生事例（輸入感染症等）において、その感染源や汚染地域を推定できる迅速な遺伝学的タイピングシステム確立の可能性が示唆された。

炭疽抵抗性動物である豚由来の AMP の中でも Protegrin-1 の抗菌効果が高かった。一方で感受性動物である羊由来の SMAP29 でも高い抗菌効果がみられたことから、動物種差よりも立体構造などの AMP の化学的性質そのものが抗菌作用機能に関与している可能性が高いと思われる。

本研究は、わが国で希少とされるバイオテロに使用される可能性のある人獣共通感染症の具体的な症例分析と病原体解析が可能になることから、公衆衛生行政への貢献度は極めて高いと考えられた。

E. 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue.

Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in

Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

F. 健康危険情報

特になし

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

分担研究「ボツリヌス菌・毒素の検査法の改良」

研究分担者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部
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 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

要旨：本研究計画のボツリヌス関連事項として、(1) ボツリヌス菌保管株の管理・識別法、(2) ボツリヌス毒素の迅速検査法について検討した。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌（Cb：*Clostridium botulinum*）とボツリヌス毒素（BoNT：*Botulinum neurotoxin*）はバイオテロに使用される可能性が高く、警戒されている。その対策として、本研究では(1) Cb株の管理・識別法と(2) BoNTの迅速検査法について研究を行った。

B. 研究方法

(1) Cb株の管理・識別法については、遺伝子型に基づく菌株の分類法の検討を行った。感染研には約80株のCb株が保管されているが、このうち最近分離された10株について、遺伝子型別と、ゲノム解析を行い、詳しく比較した。ゲノム解析は病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究で行った。

(2) BoNTの迅速検査法は、BoNTに

よって切断される遺伝子組換えタンパク質を生産し、これを使用してマウスを使わないBoNTの検出系を検討した。

C. 研究結果

(1) Cb株の管理・識別法

国内で2006年から2011年の間に分離されたCb株10株について詳細な遺伝子レベルでの比較を行った(1株がA型菌、2株がB型菌、7株がA(B)型菌)。A(B)型菌7株は、PFGE、MLVA分析などで3つのグループに分けられることがわかった。ゲノム解析によって、このうち2つは5.9kbのプラスミドをもち、もう1つは21kbのプラスミドをもつグループであることが今回明らかになった。また、10株のゲノム解析結果を、既報のCbゲノム12株とSNP分析によって比較した結果、約145,000個のSNPマーカーが抽出され、詳

細な系統樹が作成された（図 1）。国内分離の 2 株の B 型菌のうち 1 株は比較的珍しいサブタイプ B6 の毒素遺伝子を持っており、ゲノム解析による系統樹でも他の株と大きな違いが見られた。国内分離の A 型菌は海外の株と似ていたが 1,300～2,000 SNP マーカーに違いが見られた。

(2) BoNT の迅速検査法

BoNT のによって切断される SNAP25 と synaptobrevin を含む組換えタンパク質を生産し、全ての血清型の BoNT を簡便、迅速に検出できる方法をデザインした。この方法は精製 BoNT に対して、約 3 時間の検査時間でマウス法に匹敵する検出感度を示したが、夾雑物による影響を受けやすいので、検体中の夾雑物の影響を除去する手法の開発が必要である。

D. 考察

Cb や BoNT によるバイオテロ対策としては、(1) Cb 菌株の管理と識別態勢の整備、(2) Cb と BoNT の迅速検査法・消毒除去法 (3) 予防薬（トキシイドワクチン）と治療薬（抗毒素）の整備、などが考えられる、本研究では、このうち (1) Cb 株の管理・識別法と (2) BoNT の迅速検査法に焦点を当てて検討を行った。

(1) Cb 株の管理・識別法については、感染研保管の Cb 株 10 株について遺伝子型別、ゲノム解析を行った結果、詳細な菌株系統の識別ができるようになった。これらの方法論を他の保管菌株に拡張していけば、Cb 菌株の危機管理のための、保管菌株の詳細なカタログ化が可能だと考えられる。本研究班によって病原体ゲ

ノム解析研究センターとの共同研究が行えたことは、研究を進める上で非常に大きな力となった。

(2) BoNT の迅速検査法

マウス法を使用しなくても、それに匹敵する検出感度の BoNT 検出法が構築できたが、この検出感度が実現されるのは精製 BoNT に対してであり、夾雑物が多い検体では検出感度が大きく低下する。夾雑物の影響を除いて検出感を維持する手法の開発が必要になる。

E. 結論

Cb 菌保管株の危機管理に役立つと考えられる、Cb 菌の系統分類、カタログ化に利用すべき方法論が定まってきた。BoNT の迅速検査法として、改良すべき点はあるが、マウスを使用しない高感度な方法を構築した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

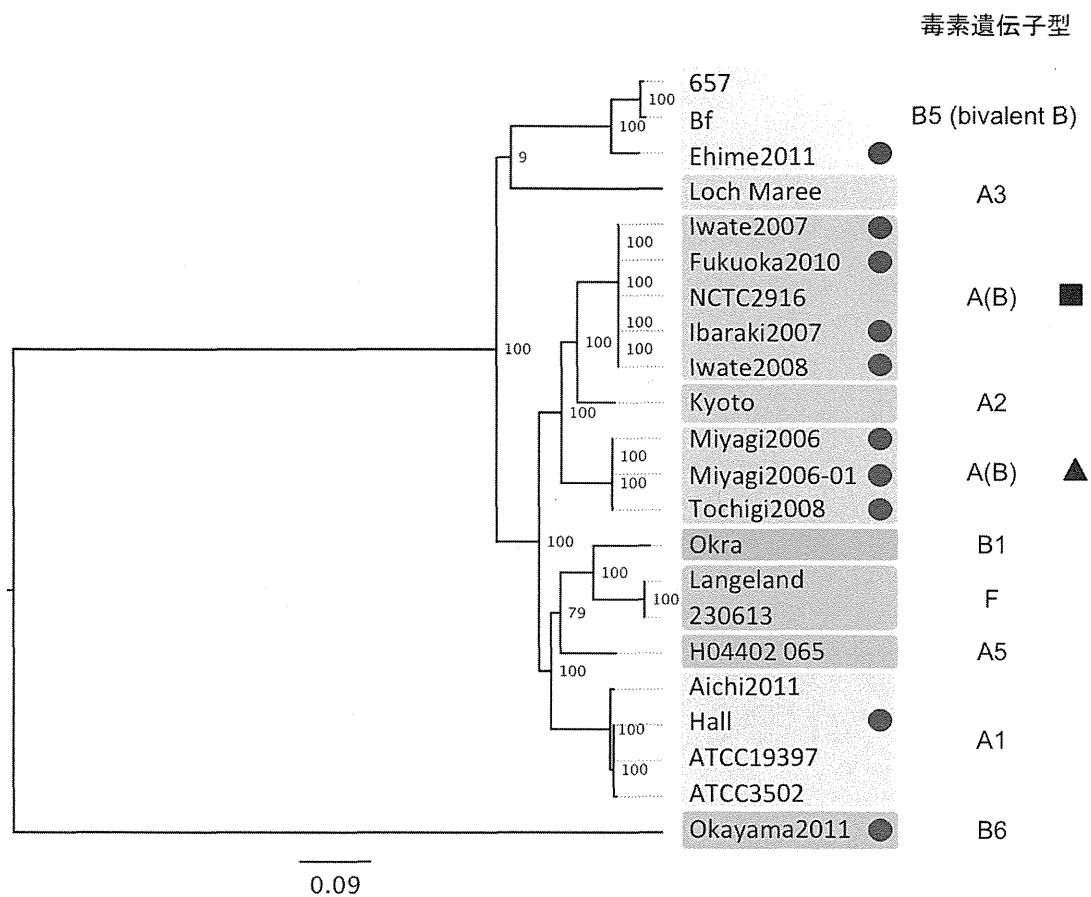
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

図 1. ゲノム解析結果に基づくボツリヌス菌株の系統樹



- 今回、解析を行った感染研保管の国内分離株
- 5.9 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ
- ▲ 21 kb のプラスミドをもつ A(B) 型菌のグループ

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

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	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：バイオテロに使用される可能性があるとして一部が特定病原体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り、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。本研究では、その基盤を構築するため、国内の常在リケッチアと輸入症例の多様性を検討するとともに、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。また、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が議論される病原体である。既存の *C. burnetii* 分離株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。次世代シーケンサーによって数種の株の全ゲノム配列を解析、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

バイオテロ・エージェントとして複数のリケッチアが指定されている。その中で、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。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、アプローチ可能かを考察するため、輸入例から分離されたリケッチアの遺伝

子解析を全ゲノム解析まで行い、リケッチア症の多様性に関し検討した。

また、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、歴史的に長くリケッチアに分類されていた。他のリケッチアと同様にバイオテロ・エージェントとして世界的に注目されている。国内の患者発生は少ないものの、ひとたび発生すれば、多くの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り、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* においても全ゲノム解析の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 輸入リケッチア症例の確認、分離・同定

熱性疾患を呈した海外渡航者の鑑別診断依頼に基づき、抗リケッチア抗体価の測定、急性期全血や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、複数の遺伝子領域を標的としたPCR、ダイレクトシーケンスを行った。また、急性期全血をL929細胞に接種し、分離を試みた。

2. 分離リケッチアの解析

分離されたリケッチアから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。

3. 海外輸入例から得られた新規リケッチアの培養とゲノム解析DNAの調整

新規リケッチア株 *Rickettsia* sp. Tenjiku をL929細胞で培養、T75培養ボトル全量を解

析のための出発材料とした。100%感染したL929細胞を培養上清とともに回収、高速冷却遠心により得た沈渣を5mL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、上清を回収後、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。

4. *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 (以下NM-NIID) と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本の感染細胞をゲノム解析に供した。上記リケッチアと同様に回収し、ペレットを1mLのPBS(-)に再懸濁、同様の細胞破碎、抽出法によりDNAを抽出した。

5. 分離リケッチアのゲノム解析

3および4で得たゲノムDNAについて次世代シーケンサー (イルミナ社マイシックMiSeq) を用いて解読した。マウスおよびサルのレファレンス・シーケンス配列に解読リードをマッピング、unmap readをCLC genome workbenchで *de novo* アッセンブルし、1 kb以上のcontigを回収した。全ゲノム情報が公表されているリケッチア種、株と比較し、SNPs系統樹解析を行った。

(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

2011年に経験した一例はユニークな検査結果となった。6病日では用いたいずれの抗原に対しても陰性であったが、12病日で *R. japonica* 並びに *R. conorii* に対する抗体価が有意に上昇、PCRでは、急性期全血材料に

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、既知の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

このリケッチアの分離に成功し、5つの領域の遺伝子領域についても検討したところ、すべて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。

2. 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読、レファレンス・シーケンスにマッピングし、残ったリケッチア由来候補をCLC genome workbenchでアッセンブルしたところ、1 kb以上のcontigが21個得られ、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個の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、解析に用いたリケッチアは明らかに他のリケッチア種と異なる新規のものであった。

(図2)

3. *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ッセンブルが問題なく可能であった。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、3つの*C. burnetii*株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相菌では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、NM-NIIDでは複数の核酸代謝系の領域が欠失していたり、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。

D. 考察

初年度(2011年)の輸入症例の一つは、*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、*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あり、分離株により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抽出自体が難しく、全血からの抽出DNAのみ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増幅酵素ではシークエ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で検出、シークエ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。リケッチア症と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のため、さらに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。

2年次は、初年度に得た新規リケッチアの全ゲノム解析によるゲノムワイドのSNPs系統解析から、このリケッチアは、部分的に行っていた *ompA*, *gltA*, *17 k-Da*, *16S*, *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。供試21個の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クエ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検討が必要である。

臨床症状からリケッチア症を疑うことが難しいことも多く、バイオテロを想定するためには、国内常在のリケッチアであるか、既知のリケッチアであるかの鑑別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。

3年次は、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一部の *C. burnetii* 株のゲノム解読を試みた。

国内保存株 *C. burnetii* 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、TK-1株は、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あり、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。しかし、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と言える。株間の比較では、核酸代謝系の遺伝子の欠失および変異が認められ、また複数の領域において、変異や欠失も認められた。一方、病原性関連領域と報告されているT4SSは、高度に保存されていた。

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基盤を作成、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。

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

を準備すべきか考慮する必要がある。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。また、*C. burnetii*によるQ熱も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, Hayaashidani 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)
- 5) 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, Emerg Infect Dis, 2013 Feb, 19(2): 338-340
- 6) 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 Return from Thailand. J Travel Med, 2013 Jan 20(1):50-53
- 7) 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, No. 160, p 27-31, 2012年10月
- 8) 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
- 9) 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, 総編集: 永井良三, 大田健, 南江堂(東京) pp935-937, 2013年3月
- 10) 安藤秀二, 日本紅斑熱, 獣医公衆衛生研究, 14: 13-17, 2012年3月
- 11) 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
- 12) 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. P 112-121, 2011年6月
- 13) Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kaw

abata H, Seishima M, *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveler with many tick bites. 2012, Acta Dermato-Venerologica, doi: 10.2340/15555-1313

14) 成田雅, 鶴沼菜穂子, 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) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

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154回日本獣医学科, 平成24年9月14～16日, 盛岡

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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

16) 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

17) 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

18) 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2
3年12月2日

19) 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

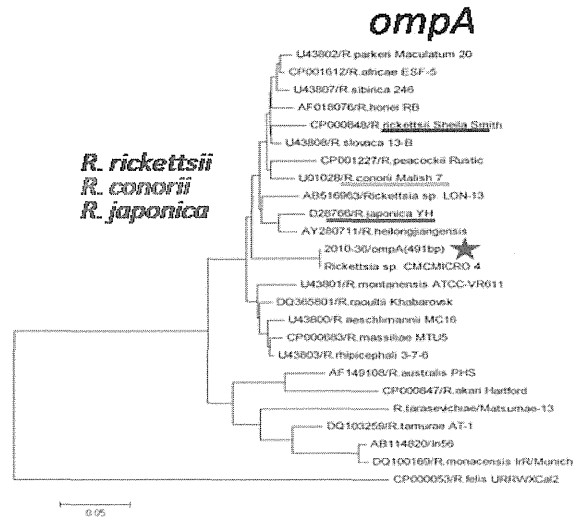


図1 検出・分離されたリケッチアのompA領域の系統樹

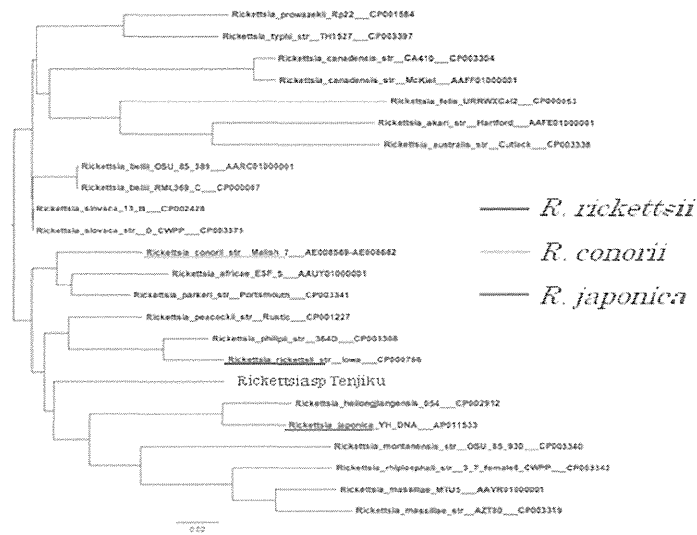


図2 新規リケッチアのSNPs系統樹

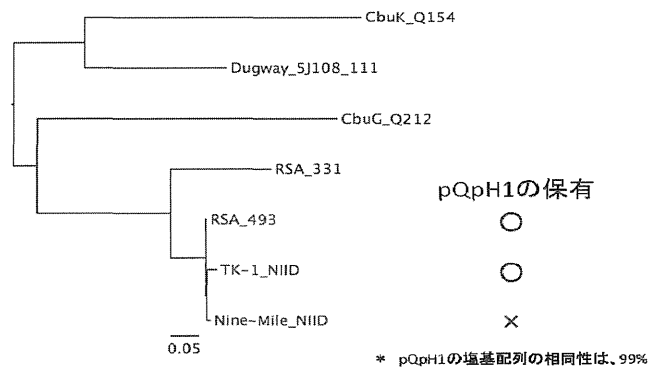


図3 SNP s 系統解析(*C. burnetii* CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出, Total SNPs: 10,947 SNPs)

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 真菌部
研究協力者 田辺公一、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てることを目的とした。本研究では、BSL 真菌の安全な取扱法について検討した。また、コクシジオイデスゲノム DNA・ヒストプラズマゲノム DNA の検出のための様々な増幅法を検討・開発した。

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

平板培地で培養されたヒストプラスマ属およびコクシジオイデス属は大量の分生子（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。

検出法の検討に用いたコクシジオイデスゲノム DNA は、千葉大学真菌医学研究センターから分与された菌株から抽出した DNA を用いた。ヒストプラスマゲノム DNA は感染研 BSL3 施設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。

Realtime PCR の標的は、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、Coi9-1 領域に LUX プライマーを設計し、それぞれ検出を試みた。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。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。

コクシジオイデス検出のための LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 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 µl 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) 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