

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孢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) 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* などの真菌から調製したゲノム 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。

## 3) 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 100 kDa 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) が選抜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 10 pg のゲノム DNA を検出することができた。

## 4) 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 100 kDa タンパク質遺伝子ともに 1 ng のゲノム DNA が検出限界であった。

## 5) 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

ヒストプラスマ属について M 抗原遺伝子および 100 kDa 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、1 ng 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属やヒストプラスマ属と判別

が困難である、*Pseudallescheria boydii*、*Schizophyllum 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。

#### 6) コクシジオイデス 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)。

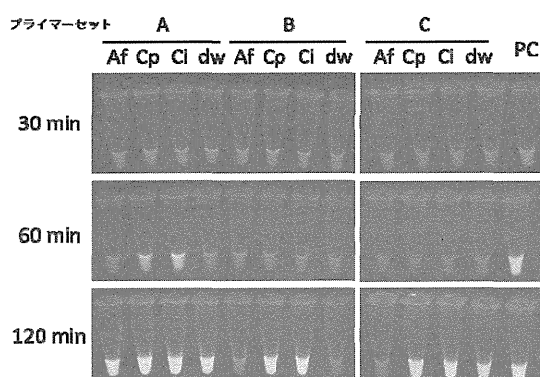


図 1. コクシジオイデス属 LAMP プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

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。水のみ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)。

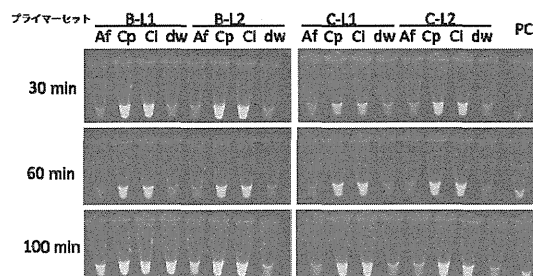


図 2. コクシジオイデス属 loop プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

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。

#### 7) 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)。

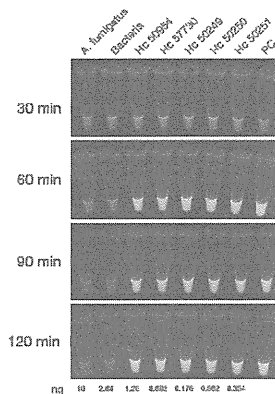


図 3 ヒストプラスマ属 LAMP 法の検討

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。

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* 属真菌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の実験系の構築が可能になると期待される。

本研究で確立した 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。

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

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属とコクシジオイデス属の迅速診断系を確立した。

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. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. 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. 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.
2. 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.
3. 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-. 化学療法領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.
4. 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. 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. 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、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)
2. 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)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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スマ属の検出. 第55回日本医真菌学会学術集会、東京、2011(10月)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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)
  11. 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)
  12. 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.
  13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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感染性材料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。この *B. pseudomallei* と *B. mallei* の LAMP 法の検討は終了した。*B. pseudomallei* の LAMP 法はタイの類鼻疽流行地域で臨床検体を用いて検討を行い、また日本国内で我々が行っている検査にも併用して性能の比較検討を行っ



た。その結果、LAMP 法は日本国内の検査に十分な性能を持つことが明らかになった。また *B. mallei* についてはこれまでに簡便な核酸検出法の報告がなかった。我々の LAMP 法は簡便に *B. mallei* を検出可能な方法であり、検出感度、特異度にも問題が無い。今後、この LAMP 法は、迅速簡便な検査法として利用できると考えられる。

国立感染症研究所で *B. pseudomallei*, *B. mallei* の検査を行ったところ、依頼機関より検体を送る前に行われた各機関での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た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た。検出法としては核酸検出法である LAMP 法とした。この方法は迅速検出法として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ため、汎用性が高いと考えられる。

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、現在のところ日本国内では方法がない。このため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、感染研に検体が搬入される前の検査が自動検査機器で行われた場合、誤同定が見受けられたため、過去の検査における誤同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、はじめは異なっていたが、利便性を考えて両者が同じ条件で試験を行えるように条件検討を行った。*B. pseudomallei* の LAMP 法は共同研究先であるタイ国コンケン大学にて臨床検体を用いて評価を行った。また、国内の検査時に、この LAMP 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.)、培養法と併用して使用し結果を比較した。*B. mallei* の LAMP 法は過去に受け付けた検査の保存検体を使用し、性能評価を行った。

#### 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、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* の外膜タンパクの分画を行った。

### 3. 自動検査機器による *Burkholderia* 属誤同定について

*B. pseudomallei* の検査を行った結果、感染研へ検体を搬入する根拠となる自動検査機器結果の誤判定が見受けられたため *B. mallei* を含めた過去の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. 研究成果

### 1. *B. pseudomallei*, *B. mallei* の迅速遺伝子検出法 (LAMP 法)

*B. pseudomallei*, *B. mallei* LAMP 法の反応条件は、検討の結果いずれも反応温度 67°C、反応時間 60 分となった。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。タイ国コンケン大学で行った、臨床検体を用いた *B. pseudomallei* の LAMP 法の検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8%であった。この検討は検出に蛍光試薬を用い、反応条件が 63°C、60 分であった。

*B. mallei* の LAMP 法では検出感度には問題が無かったが特異度に問題があった。適切なプライマー群の選択に加え反応温度を 67°C まであげることで解決された。この条件に合わせて *B. pseudomallei* の条件再検討を行った。日本国内での実用性を検証するため 4 件の

*B. pseudomallei* 検査を我々の LAMP 法を併用しておこなった。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 法で行った。その結果、*B. pseudomallei* 陽性は 3 件であった。陽性となったものは培養法、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* 陰性となった検体では、培養法でも *B. pseudomallei* であることが否定され、他の核酸検出法でも *B. pseudomallei* が陰性であった。

*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はできなかった。このため、各菌体から外膜タンパク質を分画した。

### 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

タイ国・コンケーン大学における *B. pseudomallei* の LAMP 法の臨床検体を用いた検討の結果では検出感度は 41.2%、特異度は 93.8% であった。この結果は既報の検出感度 2.3% に較べると高い検出率ではあるが、まだ十分ではない。コンケーン大学で検討を行った後、*B. pseudomallei* の反応条件についてはさらに検討を行っており、検出感度は向上していると考えられるが、類鼻疽患者の臨床検体を用いる検討は日本国内では困難であるため機会を待ちたい。*B. pseudomallei*, *B. mallei* の LAMP 法の日本国内における実用性の検討として、我々の研究機関で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。その保管臨床株を用いて *B. mallei* の LAMP 法を試みた結果、それらの臨床分離株は *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使用していく予定である。また、有事の際の検出法としても使用可能と考えている。

類鼻疽の血清学的検出法は、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、これ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* 属の自動検査機器を含むコーシャルシステムによる誤同定の問題は国外でも問題になっており、*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 *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。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* には簡便で性能の良い核酸検出法が確立されていなかったため、その開発を目指して検討を行ってきた。迅速核酸検出法には LAMP 法を適用することとした。性能の検討の結果、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* ではこれまで簡便な核酸検出法の報告がなく、この LAMP 法は今後実用的に使用可能と考える。

これらの二種類の LAMP 法は使用マニュアルを準備し要請時には配布可能な状態とした。

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ーシスの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

システムを運用する体制を整え、WHO 指定バイオテロ病原菌および未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている。

## B. 研究方法

1) 網羅配列解読による野兎病菌鑑別と病原性評価  
いわき市立総合磐城共立病院・浅野先生から供試頂いた感染症の疑いのある不明病検体(右腋窩リンパ節膿瘍)を用いて病原体検索を試みた。

➤ 網羅配列解読のライブラリー作製:

膿瘍検体から解読用 DNA ライブラリーを作成するために、NEXTERA DNA sample prep kit (EpiCentre) を用いた。

➤ 次世代シーケンサーによる網羅塩基配列解読:

次世代シーケンサー illumina GAIIX で DNA ライブラリーの網羅解読を行った。解読キットは、TruSeq SBS kit v5 (illumine)を使用した。1 サンプルにつき 3,828 万本の解読リード (125 mer) を取得した。解読リードに内在するヒトゲノム配列を bwasw マッピングソフトで削除した。残った解読リードを用いて相同性検索 (megablast) を行い、病原体を検索した。現在公開されているほぼ全ての生物種の配列を内包している米国 NCBI nt 配列データベース (2011 年 7 月 11 日版) に対して相同性検索を行い、病原体候補を検索した。得られた結果を MEGAN (v. 4. 40. 6) にて類似性が見られた生物種の一覧図を得た (MEGAN の閾値: 1 ヒット以上、score 200. 0 以上)。

2) 1 塩基バリエーション SNV による野兎病菌の株系統解析:

高病原性・野兎病菌タイプ A に属する *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU\_S4 株のゲノム情報 (GenBank ID: NC\_006570. fna) をレファレンス配列にして、maq v0. 7. 1 によるリード・マッピングを行った。phred score,  $\geq 20$ ; coverage,  $\geq 1$ ; variant frequencies,  $\geq 0. 90$  の条件で SNVs を抽出した (MapView 使用)。公開され利用可能な野兎病菌・10 株のゲノム情報を加え、該当 SNV サイトの

アレルを用いて最尤法による系統樹解析を行った (RAxML v7. 25 を使用)。

3) バイオテロ対策のための次世代型網羅的病原体検索パイプラインの開発

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターで構築した網羅的病原体検査法の情報解析のみをパイプライン化し、インタラクティブに誰でも利用できるソフトを開発した。詳細は研究結果-3, 4, 5, 6 を参照。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出を行った。患者配列を特定する作業は行わず、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。国立感染症研究所・医学研究倫理委員会にて承認済み。

## C. 研究結果

1) 網羅配列解読による病原体鑑別と病原性評価

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は WHO 指定バイオテロ病原体 (カテゴリー A) に分類され、バイオテロ対策として臨床検体から迅速に野兎病菌の遺伝情報を得ることは重要である。本研究において、野兎病菌の感染症疑いの患者の腋窩部膿瘍 (図 1) を用いて、次世代シーケンサー Illumina GAIIX による病原体の網羅的検出を行った。抗菌薬治療により膿瘍から起因菌の増殖を検出できなかったが、PCR 検査では野兎病菌陽性であった。

GAIIX にて 3,828 万本のリード (125 mer) を解読し、ヒト由来配列 (~99%) を完全に削除し、細菌と類似性を示す 833 本 (0. 002%) の解読リードを得た (図 2)。相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兎病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった (図 3)。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった (図 3)。

野兎病菌 Type A (高病原性) と Type B (低病原

性)の双方を検出したことから、SNVsを利用した亜種を分類する株系統樹解析を行った。解読で得られた野兔病菌833リード(図3参照)を用いて、野兔病菌ゲノムに特徴的なSNVサイト66箇所を検出し、株固有のSNVアレルのアライメント解析を行った(図4)。Iwaki-08は、日本分離株FSC022(Ebina)のSNVアレルと酷似しており、1箇所のみ異なっていた(nt posi.: 329, 375)。

アライメント結果を元に最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08は日本固有に分布する*F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*)と近縁であることが判明した。本症例は地域的な散发症例であり、バイオテロ使用が懸念されるType A(高病原性)とは明確に異なると鑑別することができた(図5)。

## 2) ベンチトップ型次世代シーケンサーの特徴

従来の次世代シーケンサーは大型シーケンサーという特徴から、大量配列の排出には有効である。しかしながら、バイオテロ発生等、有事に迅速に対応するためには解読時間の短縮が求められていた。大型シーケンサーよりも安価でかつ解読時間を短縮したベンチトップ型・次世代シーケンサーの登場により、従来よりも迅速に臨床検体の病原体検索が可能となった。昨年度に報告した野兔病菌感染症例を挙げると、大型シーケンサーでは最短7日間の解読・解析時間を要していたが、ベンチトップ型により2.5日にまで短縮することが可能になった。大型と比較して解読量は減るものの、臨床検体から病原体推定する場合には十分な量を得ることが分かった。

## 3) ネットワーク経由によるバイオテロ病原体検索のための解析システム

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケンサーと情報解析サーバーが整備されている。感染研に臨床検体が到着後、数日で解析・検査結果を報告できるようにはなっているものの、感染研に検体が送付されるまでには現場で数多くの微生物検査等が行われた後になってしまう

ケースが少なくない。このような現状の中、各地方自治体にも本研究課題で構築したシステムを導入して頂き、検査体制の一助となるのであれば非常に有効かつ迅速なバイオテロ対策に資するものと考えている(図6)。

本システムで特に重要なのが配列解読後の情報解析にあたる。基本、情報解析に特化した専門家が必要となるが、各自治体に人材を用意もしくは養成している余裕はない。そこで、その煩雑な解析部分ができるだけ簡便化するために、検査技師等がインタラクティブに病原体鑑別を利用できるよう、Web interfaceによる情報解析パイプラインを用意した。

## 4) 配列解読から情報解析まで

ベンチトップ型・次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)の解読リードを病院・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)を構築した(図7)。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た。本システム MePICは、感染研、地方衛生研究所においても利用可能な次世代型網羅的病原体検索システムをサポートするWeb情報解析サービスであり、現在、アカデミアのみアカウント取得可能として提供している。

<https://mepic.niid.go.jp/cgi-bin/mepic2/index.cgi>

## 5) Metagenomic Pathogen Identification pipeline for Clinical specimen: MePIC

MiSeq等の次世代シーケンサーの解読リードを下記の手順で必要な情報パラメーターを設定し、解析ボタンのワンクリックで解析をシームレスに行うことができる(図8)。

MePICで解析したMegablast解析結果は、配列アライメントを含むテキスト配列で排出される。そのテキスト配列をフリーソフトMEGAN(MEtaGenome Analyzer



<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>) で生物種毎の系統分類をおこない、病原体候補を探索していく。臨床検体に内在する数多くの候補生物が抽出されるため、ここでの探索には病原体と感染症の知識が多分に要求される。

#### 6) コアゲノム SNPs を利用した菌種・菌株の類縁関係の特定

MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、仮に炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いて病原体の由来を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した (図 9)。現在、関係者のみ運用可能としている。GcoGSA-BA は、公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータのダウンロードを可能にする。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起こさぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA) の炭疽菌の病原性に必須な因子の特定も可能にした。

今後、ペスト、野兔病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である。

#### D/E. 考 察・結 論

患者リンパ節膿瘍検体から網羅解読法で病原体・野兔病菌を検出し、その特徴的な株固有 SNVs を利用することで、病原性の強弱に関する遺伝情報を得ることができた。野兔病菌は病原性が異なる subsp. に分類され、北米由来の高病原性 Type A であるのか、低病原性 Type B による散発的な地域発生であるのか明確に分類する必要がある。これまでの分担研究におけるデータベース構築のもと、野兔病菌の網羅的なゲノム情報の収集とデータベース化を完了しており、本事例の解析を短期間で完了することができた。

構築データベースを有効に活用するためには、迅速な解読リード配列の取得が望ましく、そのためには多くの難題が残っている。課題として、情報解析

の工程に特化して迅速性を追求したシステム改善を行った。今後、様々な工程の中でボトルネックになっている箇所を効率よく改善し、総合的なシステム化に貢献したいと考えている。NGS - MePIC - MEGAN - GcoGSA の解読・解析パイプラインを開発し、実際に運用できるところまで完了した。未だ解消されていないボトルネックが残っていることは事実だが、誰もが簡単に利用できるシステムが先行していけば、シーケンサー等のインフラ整備が後々追いついてくるものと考えている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Detection of a Possible Bioterrorism Agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen using Next-generation Direct DNA Sequencing. Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Fumiaki Shinya, Fumihiko Takeuchi, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, Shigeyuki Asano. J Clin Microbiol. 2012, 50 (5): 1810-1812.
- MePIC, Metagenomic Pathogen Identification for Clinical Specimens. Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yumiko Ogasawara, Katsumi Mizuta, and Makoto Kuroda. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67 (1): 62-65.

##### 2) 学会発表

黒田誠、関塚剛史、竹内史比古。Deep sequencing 法による野兔病菌 *Francisella* 感染症の腋窩部膿瘍の網羅的病原体検索第 85 回日本細菌学会・総会 長崎市 2012 年 3 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

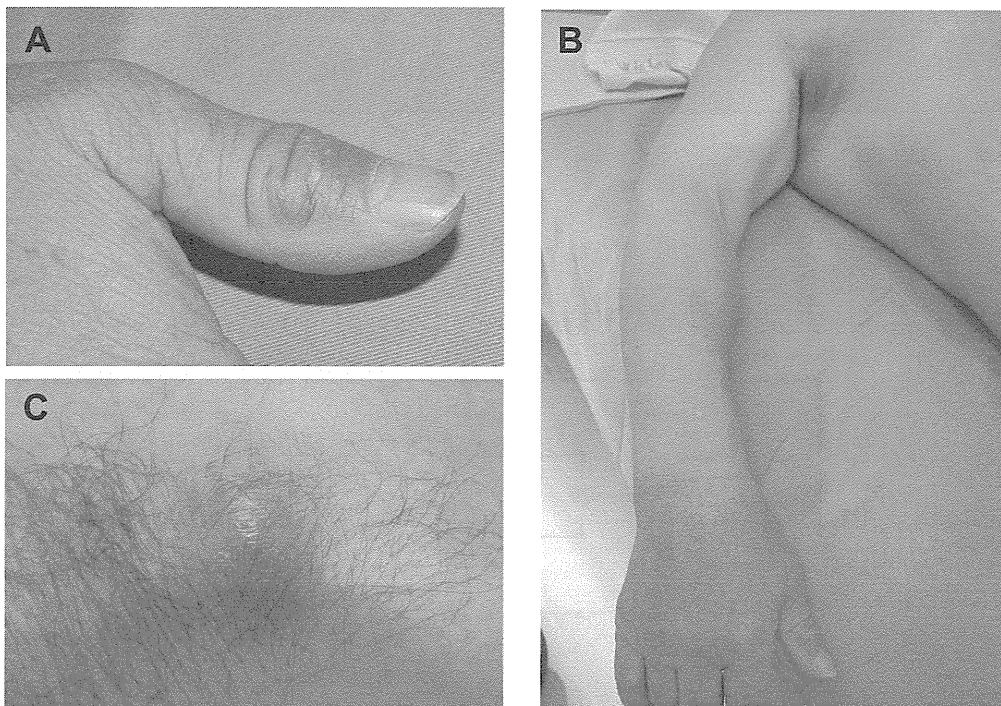
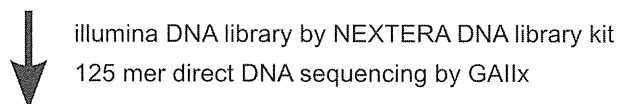
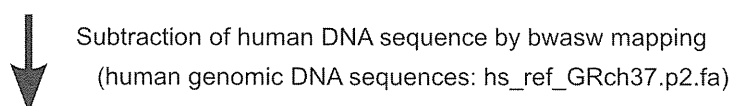


図1 患者 (Iwaki-08) の臨床所見。A) 右親指、B) 右腋窩リンパ節、C) Bの拡大図

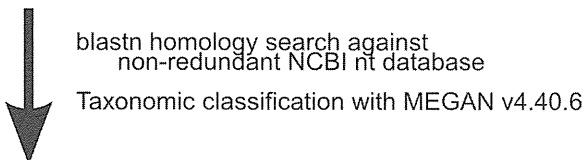
DNA extracted from clinical specimen (abscess)



38,285,502 reads (125 mer)



48,223 reads (125 mer)



Detection of *Fracsella* sp. sequences (833 reads: 0.002%)

図2 Iwaki-08 患者の右腋窩リンパ節膿瘍からの病原体検索パイプライン

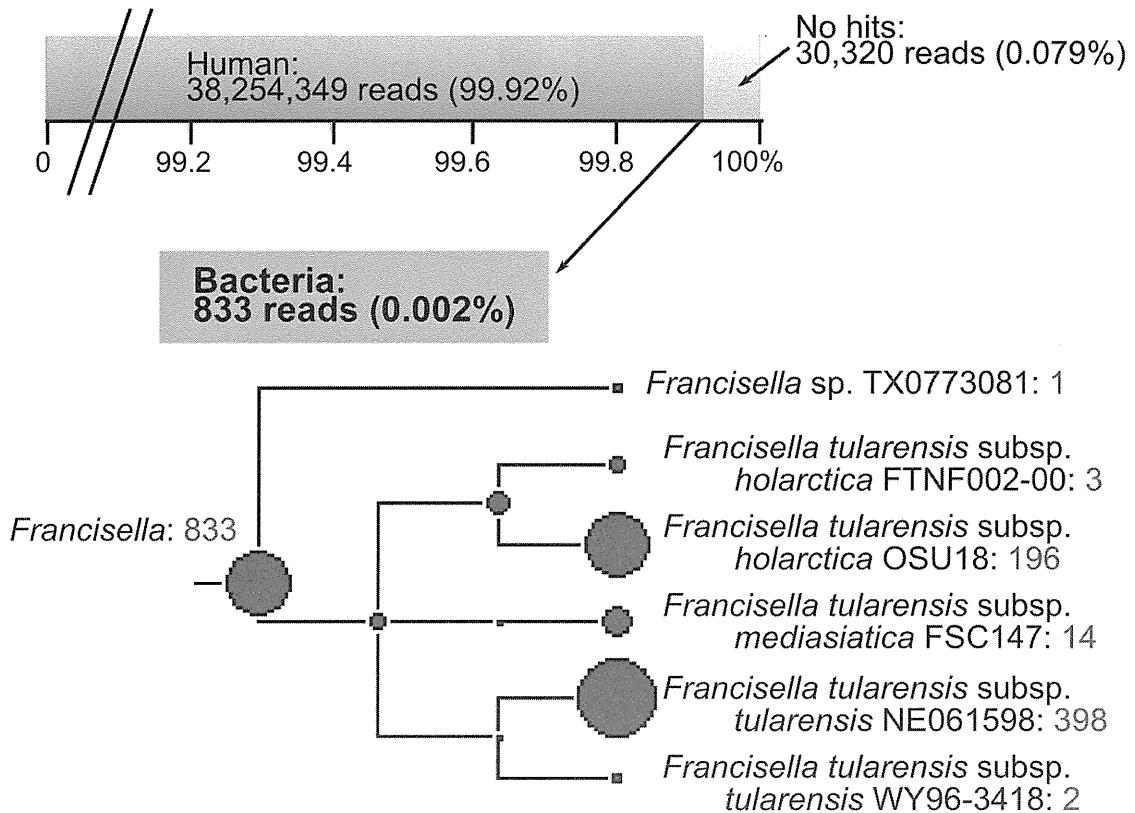


図3 イルミナ網羅解読にて取得した解読リードの解析。99.92%が膿瘍由来のヒト配列であり、細菌 bacteria と思われる配列は833リード(0.002%)たらずであった。ウイルス様配列は検出されなかった。細菌配列の相同性検索で得られた結果を taxonomy で分類したところ、全て野兔病菌 *Francisella tularensis* に相当する配列であった。*Francisella* の系統関係と subsp. そして、該当する系統のヒット・リード数(赤字)で示している。高病原性 Type A. *F. tularensis* subsp. *tularensis* と低病原性 Type B. subsp. *holarctica* との両方が約半数ずつヒットし、単純な相同性検索のみでは感染病原体の病原性を評価できなかった。

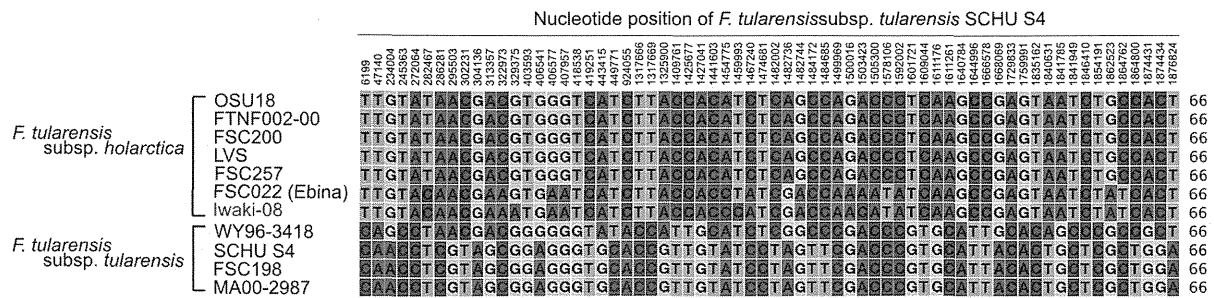


図4 解読で得られた野兎病菌 833 リード (図3 参照) を用いて、野兎病菌ゲノムに特徴的な SNV サイト 66 箇所を検出した。ゲノム・レファレンス配列 SCHU S4 株のゲノム・ポジションと、株固有の SNV アレルを表記し、それらをアライメント解析した。Iwaki-08 は、日本分離株 FSC022 (Ebina) の SNV アレルと酷似しており、1 箇所のみ異なっていた (nt posi.: 329, 375)。

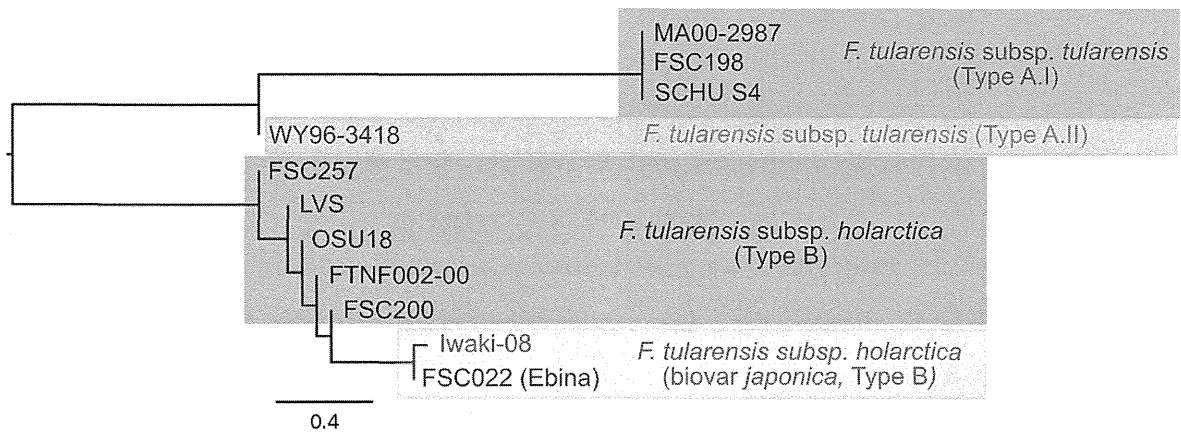


図5 図4で解析したアライメントを元に、最尤法で系統樹を作成した。Iwaki-08 は明らかに *F. tularensis* subsp. *holarctica* (biovar *japonica*) に属し、高病原性 Type A とは明確に異なることが明らかになった。