

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

分離されたりケッチアから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) 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、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 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増幅酵素ではシーケ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、シーケ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 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, Hayashidani 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 Returning 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ML S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 |

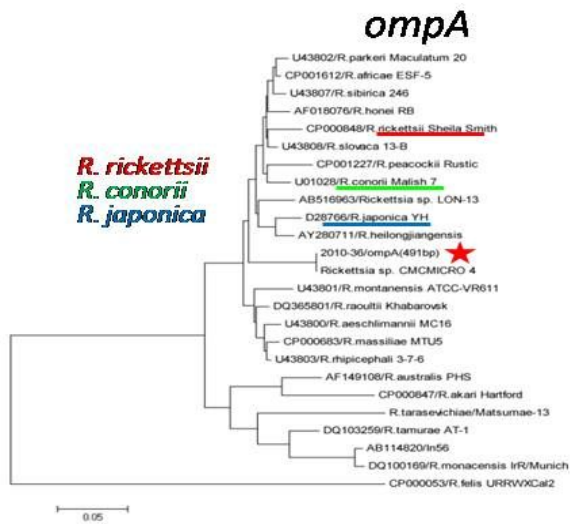


図1 検出・分離されたリケッチアのompA領域の系統樹

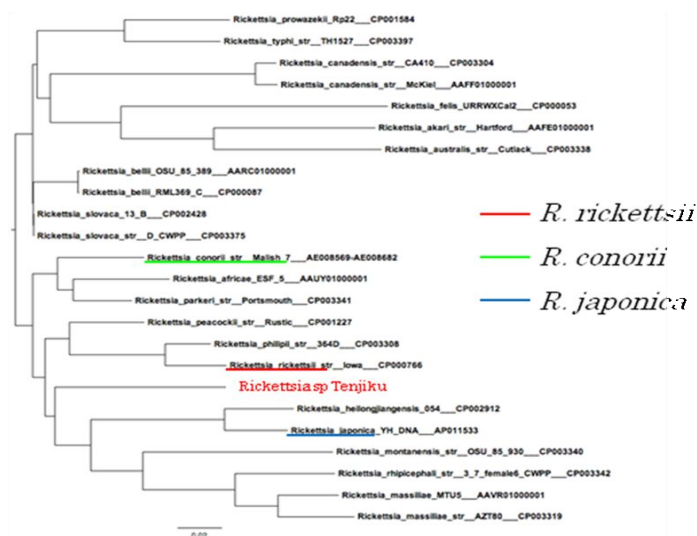


図2 新規リケッチアのSNPs系統樹

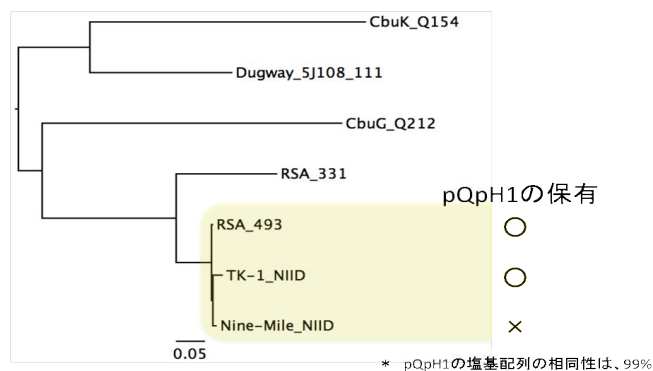


図3 SNPs系統解析(*C. burnetii* CbuG Q212 をreferenceにしてSNPを抽出, Total SNPs: 10,947 SNPs)