

図4. デングウイルス4型(D4)の遺伝子系統樹

D4型はすべてフィリピンからの輸入症例であった株名にEiIDが入っているものが台湾の株

2013 D4

結核菌の薬剤耐性 Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Taiwan CDC)  
NDM-1 型薬剤耐性菌 NDM-1 carbapenemase-producing bacteria (Vietnam NIHE)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)  
Keigo Shibayama (Department of Bacteriology II, NIID)

### 研究要旨

これまでに台湾で分離された INH 耐性結核菌で、既存の耐性検出用 DNA プローブに含まれていない *katG* 遺伝子の変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A の変異を見出した。C317T、G332A の変異は、酵素の活性中心のアミノ酸残基を置換させることで酵素活性に影響を与えていることが分かった。今後、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。そして INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良を目指す。台湾を始めアジア各国で結核罹患率の高い国で薬剤耐性結核の迅速診断に役立つことが期待される。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで輸入事例を中心に 10 例ほど報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離されている。ベトナムで分離された NDM 遺伝子陽性の *Acinetobacter baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法として用いられてきた SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌検出に応用できるか検証した。メロペネム、セフトジジム、及び SMA ディスクの組み合わせで検出が出来ることが分かった。

The emergence of drug resistant tuberculosis is a public health concern. The resistance to isoniazid (INH) can be detected by a convenient PCR-based amplification and reverse blotting assay. However, discordant results have been observed for several resistant strains isolated in Taiwan. Some INH resistant strains carried new mutations, C1436A, C317T, G332A, and insertion of GA at 235 of *katG* gene. Among them, C317T and G332A were shown to be associated with alteration of enzyme activity by *in silico* analysis.

The collaborative study with NIHE aimed at evaluating the SMA test for detecting NDM-1 producers among *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. A collection of 16 NDM-1-positive bacterial isolates (5 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter freundii*, and 4 *A. baumannii*), obtained from hospitals in Vietnam in 2010, and 1 *K. pneumoniae* isolated in Japan in 2010, were used. SMA test using both MPM and CAZ disks was shown to be the most suitable for screening carbapenem-resistant isolates for NDM-1-type MBL producers.

### 研究協力者

森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部)  
金 玄 (国立感染症研究所・細菌第二部)  
松井 真理 (国立感染症研究所・細菌第二部)  
鈴木 仁人 (国立感染症研究所・細菌第二部)  
鈴木 里和 (国立感染症研究所・細菌第二部)  
和知野純一 (名古屋大学医学部・細菌学)

### Collaborators in Japan:

Shigetaro Mori, Department of Bacteriology II, NIID  
Hyun Kim, Department of Bacteriology II, NIID  
Mari Matsui, Department of Bacteriology II, NIID  
Masato Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID  
Satowa Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID  
Jun-ichi Wachino, Department of Bacteriology, Nagoya University

### A. 研究目的

薬剤耐性結核菌は世界の深刻な社会問題の一つである。治療薬であるイソニアジド (INH) に対する耐性菌はよく分離されるが、耐性は *katG*、*ndh* などの遺伝子の変異による。これらの変異を標的とした DNA プローブによる迅速検出法が実用化されているが、台湾 CDC では、その DNA プローブに含まれない変異を持つ耐性株が分離されている。台湾 CDC との共同研究では、台湾 CDC で収集されたこれらの株を用いて感染研で新たな遺伝子変異を見出すとともに、それらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかについても感染研で解析することとした。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、2008 年にインド、パキスタンで見いだされてから世界中に拡散している。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで輸入事例を中心に 10 例ほど報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離される。発展途上国では医療機関だけでなく環境中にも蔓延していることが報告されている。

今年度は、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法として広く用いられている SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の検出にも応用できるかどうかを検証することとした。

## B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、加熱死菌を感染研に送付し、感染研ではゲノム DNA を抽出したのち、*katG*、*ndh* 遺伝子の変異を調べ、過去に報告がないものを選び出した。

ベトナム NIHE においては、医療機関からカルバペネム耐性菌を収集し、PCR 法で NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を検出した。分離された NDM 型遺伝子陽性の *Acinetobacter baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本国内で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、従来メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法として用いられてきた SMA ディスク法で SMA による阻害効果が見られるかを観察し、この方法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに応用できるか検証した。

倫理面への配慮 該当なし。

## C. 研究結果

台湾 CDC で収集した結核菌で、INH 耐性のものについて遺伝子の変異のスクリーニングを実施し、過去に耐性との関連が証明された変異部位以外の変異を持つ株について加熱死菌を感染研に送付してもらった。感染研にて、ゲノム DNA を抽出した後、*katG* 遺伝子、*ndh* 遺伝子の変異をスクリーニングした。結果を Table 1 に示す。これまでに報告が無い新規の変異で新たに見つかったのは、*katG* 遺伝子の 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A だった。これらは、アミノ酸残基では挿入によるものは frame shift、塩基の mutation のものでは Ala106Val、Gly111Asp に相当する。*In silico* 解析で、これらのアミノ酸残基は、蛋白の活性中心に存在することが分かった(図 1 A, B)。



図 1 A、KatG 全体像

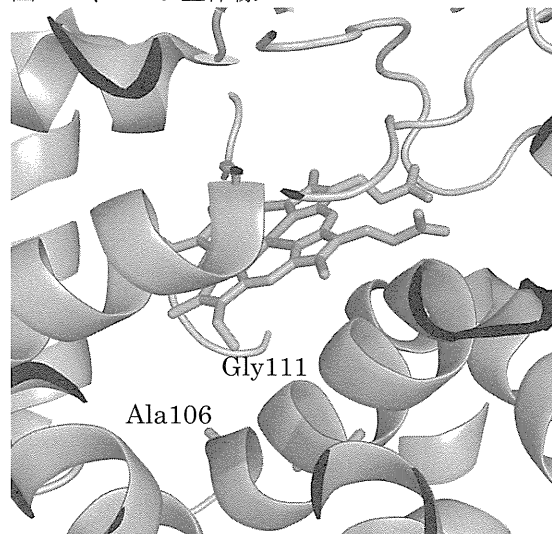


図 1 B KatG の活性中心部分

このことから、これらの変異は KatG 蛋白の酵素活性に影響を与えていることが推測された。

ベトナムハノイ市内の医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌及び *A. baumannii* を用いて、SMA ディスク法の評価を行った。通常、SMA ディスク法で推奨されているセフトジジム(CAZ)ディスクの他、イミペネム(IPM)ディスク、メロペネム(MPM)ディスクと SMA ディスクによる組み合わせの結果を Table 2 に示す。CAZでは、16 株中 7 株でのみ SMA の阻害効果が観察され、検出可能であった。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、多くの場合 SMA ディスクに阻害を受けない他のタイプの $\beta$ -ラクタマーゼも同時に産生することが報告されており、このため検出率が低かったと考えられる。IPM では 1 4 株、MPM では 1 5 株で阻害効果が観察され、検出可能となった。MPM 及び IPM

で陰性と判定された株では CAZ で陽性と判定された。この株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も同時に持っていた。OXA-48 型カルバペネマーゼは、SMA により阻害を受けないため、この影響で IPM、MPM いずれでも特徴的な阻止円が形成されなかったと考えられる。そして OXA-48 型カルバペネマーゼの CAZ 分解能は低いため、NDM 型カルバペネマーゼの SMA による阻害が CAZ でのみ観察されたと考えられる。

#### D. 考察

結核菌の INH 耐性株で、これまでに報告がない *katG* 遺伝子の変異を見いだした。INH は菌体内に取り込まれた後、KatG 蛋白により代謝され活性形に変換される。*In silico* による 3 次元構造の解析から、これらの変異により KatG 蛋白の活性が失われることで INH 耐性が誘導されていると推測された。今後、実際に蛋白を精製し、活性の測定を行う予定である。これらの変異が実際に耐性に関与していることを確認した上で、現行の INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良につなげる予定である。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、従来推奨されていた CAZ ディスクに MPM ディスクを組み合わせる事で、検出が出来る事が分かった。ここで、SMA ディスク法は NDM 型カルバペネマーゼ産生菌だけでなく、IMP 型や VIM 型など他のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌も検出する。SMA ディスク法は安価で簡便なため、本法をまずスクリーニングとして用い、PCR 等で遺伝子を確定することで、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を効率的に検出出来ると考えられる。

#### E. 結論

台湾で分離された INH 耐性結核菌において *katG* 遺伝子に新たな遺伝子変異を見いだした。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに、SMA ディスク法が応用出来る事が分かった。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*.

Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. *Jpn J Infect Dis*. 2014;67(1):66-8.

- 2) わが国における NDM 型および KPC 型カルバペネ

マーゼ産生菌分離状況(2013 年 7 月現在)

鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子  
吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾

病原体微生物検出情報(IASR) 34:238-9, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) SMA ディスク法を使った NDM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株スクリーニング方法の検討  
松井真理 和知野純一 鈴木里和 柴山恵吾  
第 25 回日本臨床微生物学会総会、平成 26 年 2 月、名古屋

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

Table 1.

No. of isolates	Mutation		Codon	Amino Acid	Notes
	Gene	Nucleotide No.			
1	<i>katG</i>	G→T position 388	CGG→CTG	Arg463Leu	
2	<i>katG</i>	T→C position 271	TGG→CGG	Trp91Arg	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
3	<i>katG</i>	G and A inserted after position 235 -		Frameshift	novel mutation
7	<i>katG</i>	A→G position 413	AAC→AGC	Asn138Ser	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
8	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
	<i>katG</i>	C→A position 1436	GCG→GAG	Ala479Glu	novel mutation
	<i>ndh</i>	T→C position 203	ATC→ACC	Ile68Thr	novel mutation*
10	<i>katG</i>	A→C position 884	CAG→CCG	Gln295Pro	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
11	<i>katG</i>	C→T position 317	GCG→GTG	Ala106Val	novel mutation
		G→A position 332	GGC→GAC	Gly111Asp	novel mutation
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
12	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
13	<i>katG</i>	C→T position 357	CGC→CGT	Arg119Arg (silent)	
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	

\*H24 年報告済。

Table 2. Inhibitory activity of sodium mercaptoacetate (SMA) disks for New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-1-producing bacterial isolates

Bacterial isolates	Antibiotic disks		
	Ceftazidime (CAZ)	Imipenem (IPM)	Meropenem (MPM)
<i>E. coli</i> V-22	+	+	+
<i>E. coli</i> V-48	+	+	+
<i>E. coli</i> V-91	-	+	+
<i>E. coli</i> V-102	-	+	+
<i>E. coli</i> V-134	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> MRY10-722	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> V-17	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-21	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-90	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-182	-	+	+
<i>E. cloacae</i> V-87	+	-	-
<i>C. freundii</i> V-868	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-275	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-303	+	+	+
<i>A. baumannii</i> V-320	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-357	-	+	+

(+), positive; (-), negative; *E. coli*, *Escherichia coli*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; *C. freundii*, *Citrobacter freundii*; *A. baumannii*, *Acinetobacter baumannii*

## Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*

Jun-ichi Wachino<sup>1,2</sup>, Mari Matsui<sup>1</sup>, Hoang Huy Tran<sup>3</sup>,  
Masato Suzuki<sup>1</sup>, Satowa Suzuki<sup>1</sup>, and Keigo Shibayama<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011;

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine,  
Nagoya 466-8550, Japan; and

<sup>3</sup>National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam

Communicated by Makoto Ohnishi

(Accepted September 24, 2013)

New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-1 carbapenemase-producing bacteria are resistant to antibiotics of the carbapenem family, which are used as a last resort for the treatment of infectious diseases caused by drug-resistant bacteria. Therefore, the emergence of these bacteria presents a serious public health issue. This is particularly true given that NDM-1 carbapenemase has been detected in many clinical isolates worldwide since it was first identified in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a patient hospitalized in New Delhi (1). The NDM-1 carbapenemase gene has been predominantly identified in *Enterobacteriaceae*, but it can also occur in non-fermenters (2). Hence, it is necessary to monitor the emergence and spread of NDM-1 producers with a convenient and effective screening method.

NDM-1 carbapenemase is a class B zinc metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) (3). A variety of techniques have already been developed to detect MBL producers (4), including a disk-based synergy test, the sodium mercaptoacetate (SMA) test, which is conventionally used in Japanese clinical microbiology laboratories (5). This test uses a Kirby-Bauer (KB) disk containing a  $\beta$ -lactam antibiotic (ceftazidime [CAZ] recommended) and a disk containing SMA, an MBL inhibitor that can bind to the MBL active site through interactions with zinc ions (6). Although this test works well for the detection of IMP- and VIM-type MBL producers, which are the predominant MBL types in Japan (7), preliminary results have indicated that it may fail to detect NDM-1 producers when using the SMA test with the CAZ disk according to general recommendations (8). Hence, the present study aimed at improving the SMA test by replacing the CAZ disk for detecting NDM-1 producers among *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*.

A collection of 15 NDM-1-positive bacterial isolates (5 *E. coli*, 4 *K. pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1

*Citrobacter freundii*, and 4 *A. baumannii*), obtained from hospitals in Vietnam in 2010, and 1 NDM-1-positive *K. pneumoniae* strain (MRY10-722) isolated in a hospital in Japan in 2010, were used in this study. These isolates were identified using the API 20E and Vitek2 systems (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Identification of *A. baumannii* isolates was further confirmed by *rpoB* gene sequencing (9). The NDM-1 gene was detected using PCR analysis with specific primers as described previously (10).

A total of 16 isolates were subjected to the SMA test. The inhibitory effect of CAZ was compared with that of the carbapenems, imipenem (IPM) and meropenem (MPM). Suspensions of the bacterial isolates were adjusted and spread on Mueller-Hinton agar plates according to the protocol recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (11). The KB disks containing  $\beta$ -lactam antibiotics (CAZ [30  $\mu$ g] or IPM [10  $\mu$ g] or MPM [10  $\mu$ g]) (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) were placed on the plates, and disks containing SMA (3 mg) (Eiken Chemical) were placed close to 1  $\beta$ -lactam disk as shown in Fig. 1. The center-to-center diameter between the KB disk and the SMA disk was 16 mm. The plate was incubated at 35°C for 18 h and the growth-inhibitory zone around the KB disk close to the SMA disk was compared with that around the KB disk alone. An isolate was considered MBL-positive when an apparent expansion was observed, i.e., an enlargement of 5 mm or greater of the growth-inhibitory zone around the KB disk close to the SMA disk compared with that around the KB disk alone (Fig. 1, middle and lower panels). An isolate was considered MBL-negative if there was no expansion of the growth-inhibitory zone or if the expansion was less than 5 mm (Fig. 1, upper panel).

The results are summarized in Table 1. The highest sensitivity was obtained with a combination of the MPM and SMA disks. Of the 16 strains, 15 (93.8%) were confirmed as positive. The combination of the IPM and SMA disks resulted in the positive identification of 14 strains (87.5%). On the other hand, a combination of the CAZ and SMA disks was considerably less sensitive, as only 7 strains (43.8%) had positive results.

These results indicated that the carbapenems, IPM and MPM, are generally more suitable than CAZ for

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771, ext. 3500, Fax: +81-42-561-7173, E-mail: keigo@niid.go.jp

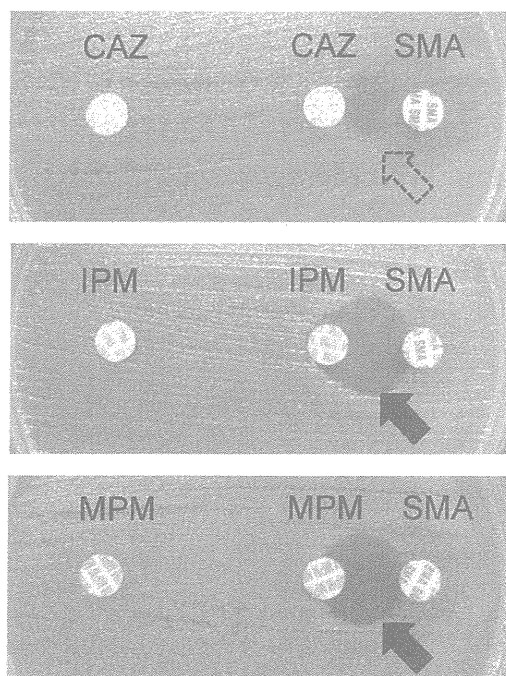


Fig. 1. Results of the disk-based synergy test, the sodium mercaptoacetate (SMA) test, for the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-1-producing *Acinetobacter baumannii* isolate V-275. Apparent expansion of the growth-inhibitory zone (black arrows) between SMA and imipenem (IPM)/meropenem (MPM) disks were observed. On the other hand, a very slight inhibitory effect (arrow with dashed black line) was observed between the ceftazidime (CAZ) and SMA disks.

detecting NDM-1-producing bacteria. The low sensitivity of the CAZ disk could be ascribed to the coproduction of other  $\beta$ -lactamases such as extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated or chromosomally encoded AmpC  $\beta$ -lactamases, which inactivate CAZ without being inhibited by SMA. In fact, it has been reported that NDM-1-producers often simultaneously carry other  $\beta$ -lactamase genes, such as *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, or *bla*<sub>DHA</sub> (12,13). Nevertheless, 1 *E. cloacae* isolate (V-87) produced a clearly enlarged inhibitory zone between the SMA and CAZ disks but not between SMA and MPM or IPM, suggesting the importance of CAZ. We hypothesized that these findings may have been owing to the coproduction of OXA-48 carbapenemase, which is usually resistant to MPM but not to CAZ. The OXA-48 carbapenemase is a member of the serine- $\beta$ -lactamases, whose activities are not inhibited by SMA. We used PCR to screen all isolates for the presence of *bla*<sub>OXA-48</sub>. As expected, only the *E. cloacae* isolate V-87 carried the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene; however, further examinations with additional isolates are required to confirm our hypothesis.

On the basis of these results, we conclude that the SMA test using both the MPM and CAZ disks is the most suitable method for screening carbapenem-resistant isolates for NDM-1-type MBL producers. As reported previously (8), this combination also allows for highly sensitive and specific detection of the IMP- and VIM-type MBL producers. Effective screening of MBL producers, including the NDM-1 type and other MBL types, can therefore be performed by the SMA test using

Table 1. Inhibitory activity of SMA disks for NDM-1-producing bacterial isolates

Bacterial isolate	Antibiotic disk		
	CAZ	IPM	MPM
<i>E. coli</i> V-22	+	+	+
<i>E. coli</i> V-48	+	+	+
<i>E. coli</i> V-91	-	+	+
<i>E. coli</i> V-102	-	+	+
<i>E. coli</i> V-134	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> MRY10-722	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> V-17	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-21	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-90	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-182	-	+	+
<i>E. cloacae</i> V-87	+	-	-
<i>C. freundii</i> V-868	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-275	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-303	+	+	+
<i>A. baumannii</i> V-320	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-357	-	+	+

SMA, sodium mercaptoacetate; NDM, New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MPM, meropenem; +, positive; -, negative.

MPM and CAZ disks in clinical laboratories followed by confirmation of the MBL genes by PCR analysis in specialized laboratories.

**Acknowledgments** We thank the Saitama City Institute of Health Science and Research for providing the NDM-1-positive *K. pneumoniae* strain MRY10-722. We are grateful to Yoshichika Arakawa, Professor at the Nagoya University Graduate School of Medicine, for the valuable comments on the manuscript.

This study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (grant no. H23-Shinkou-Shitei-020 and H24-Shinkou-Ippan-010) and by a research grant of National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam.

**Conflict of interest** None to declare.

## REFERENCES

1. Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., et al. (2009): Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 5046-5054.
2. Johnson, A.P. and Woodford, N. (2013): Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol.*, 62, 499-513.
3. Nordmann, P., Naas, T. and Poirel, L. (2011): Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 1791-1798.
4. Willems, E., Verhaegen, J., Magerman, K., et al. (2013): Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 41, 99-109.
5. Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., et al. (2000): Conventional test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 40-43.
6. Wachino, J., Yamaguchi, Y., Mori, S., et al. (2013): Structural insights into the subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 101-109.
7. Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., et al. (2003): PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrase car-



- ried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5407-5413.
8. Hattori, T., Kawamura, K. and Arakawa, Y. (2013): Comparison of test methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66, 512-518.
  9. La Scola, B., Gundi, V.A., Khamis, A., et al. (2006): Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 827-832.
  10. Hoang, T.H., Wertheim, H., Minh, N.B., et al. (2013): Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*, 51, 373-374.
  11. Clinical and Laboratory Standards Institute (2010): Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; 9th informational supplement. Approved standard M2-A10. Wayne, Pa.
  12. Sekizuka, T., Matsui, M., Yamane, K., et al. (2011): Complete sequencing of the *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One*, 6, e25334.
  13. Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., et al. (2011): The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.*, 19, 588-595.

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）  
平成 25 年度分担研究報告書

研究課題： アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進  
と共同研究体制の強化に関する研究（H23-新興-指定-020）

研究代表者： 国立感染症研究所・副所長 倉根 一郎

分担研究課題： 非結核性抗酸菌感染症の研究

研究分担者： 国立感染症研究所・免疫部長 阿戸 学

研究協力者： 台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室・請負人 周 如文

研究協力者： 国立台湾大学医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源

研究協力者： 国立感染症研究所・免疫部主任研究官 松村 隆之

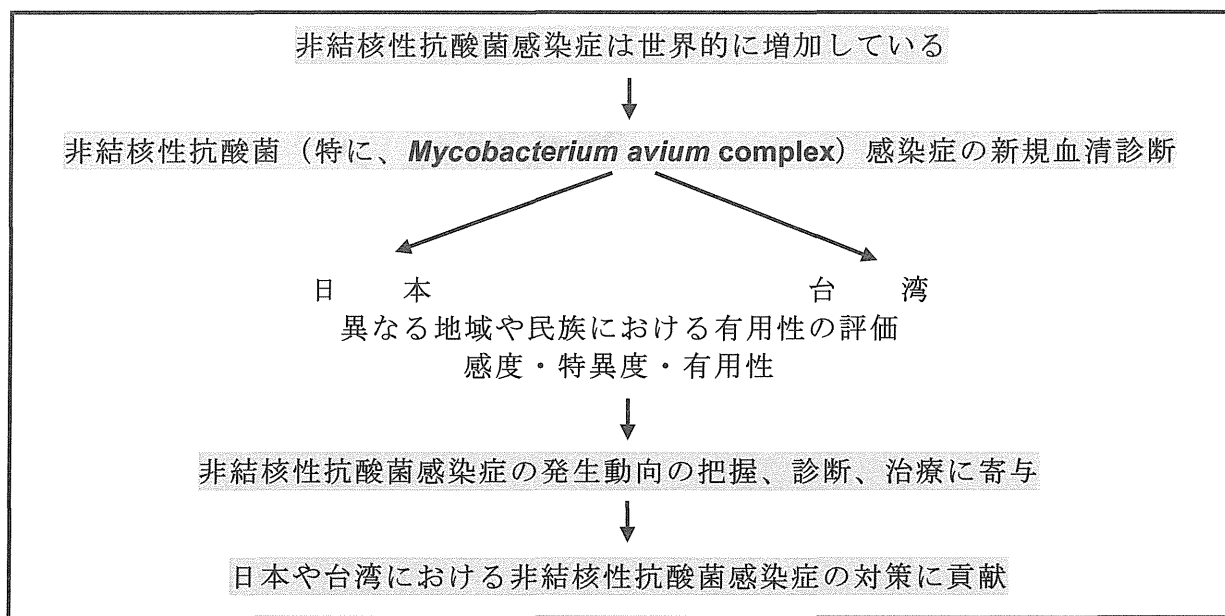
研究協力者： 新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学教授 松本 壮吉

研究協力者： 国立病院機構刀根山病院・副院長 前倉 亮治

研究協力者： 国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医長 北田 清悟

研究要旨

- 活動性非結核性抗酸菌（特に、*Mycobacterium avium complex* : MAC）感染症の迅速簡便血清診断（所要：約 3 時間）の研究開発に関し、台湾-日本（台日）共同研究を推進した。研究分担者は血清診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の開発に寄与し、本キットは体外診断用医薬品製造販売承認（厚生労働省）され、保険医療対象検査項目となった。さらに、民間検査機関（BML）の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。しかし、本キットの異なる地域や民族における有用性に関する国際評価は未了である。平成 25 年度の共同研究成果として、1）台湾の MAC 感染症患者血清を収集、2）MAC 抗体価を測定し、感度：61%、特異度：91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であることが示された。



A. 研究目的

非結核性抗酸菌（NTM）感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20%（世界：100-200 万人）を占め、

世界的に増加している。日本では、年間約 9000 人を越える新規患者が発生していると推定されている。特に、*Mycobacterium avium complex*（MAC）感染

症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80%を占め、最頻である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成される。アメリカ合衆国胸部疾患学会および感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致した活動性 MAC 感染症に関し、感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体検出の診断キットを開発した。国内検体では診断感度：84%、特異度：100%、また、所要時間は 3 時間 (従来法では約 1 か月) であり、高い臨床的有用性を示し、厚生労働省は体外診断用医薬品製造販売承認し、保険医療品目として記載されている (2011 年 8 月)。加えて、2012 年 9 月から民間検査機関 (BML) の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。

この診断キットは GPL 特異的 IgA 抗体応答を指標しているため、人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。加えて、非結核性抗酸菌感染症は地域により、原因菌種の頻度が異なることが知られている。

本診断キットの国際的有用性を検証するため、日本と異なる地域や民族 (台湾) における性能評価を目的とした。

## B. 研究方法

### 活動性抗酸菌感染症の血清

抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) 患者の血清を収集する。

### キャピリア® MAC 抗体酵素免疫測定 (ELISA) による血清抗体価の測定

MAC 感染症の MAC 特異抗原に対する血清 IgA 抗体を検出する迅速血清診断キット (所要: 約 3 時間、カットオフ値: 0.7 U/mL、キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ) を用い、血清抗体価を測定する。

### 倫理面への配慮

ヒトを対象とする医学研究倫理に関し、国立感染症研究所や国立台湾大学病院で機関承認を得ている。なお、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 対象患者候補の選定

抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) 患者候補を選定した。診断基準 (2007 年) に合致した活動性肺 MAC 感染症: 57 症例、MAC 混入 (contamination): 11 症例、*M. kansasii* 感染症: 14 症例、迅速発育型非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum* など) 感染症: 26 例、活動性結核: 48 症例、結核患者の濃厚接触者: 42 症例から血清を収集した。

### キャピリア® MAC 抗体酵素免疫測定 (ELISA) による血清抗体価の測定

活動性肺 MAC 感染症で血清抗体陽性は 34、陰性は 23 症例、MAC 混入 (contamination): 陽性は 1、

陰性は 10 症例、*M. kansasii* 感染症ではすべて陰性であり、迅速発育型非結核性抗酸菌感染症: 陽性は 7、陰性は 19 症例、活動性結核陽性: 5、陰性は 10 症例、結核患者の濃厚接触者: 陽性は 2、陰性は 42 例、血清診断キットの感度は 61%、特異度は 91% であった。

## D. 考察

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 10-20%を占め、世界的に増加している。特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80%を占め、最頻である。NTM 感染症の診断は米国胸部疾患学会/感染症学会の診断基準 (2007 年) により、診断される。その骨子は 1) 臨床症状 (慢性咳嗽、喀痰、発熱など)、2) 画像所見 (浸潤、空洞、気管支拡張) および 3) 細菌学的所見 (喀痰培養: 2 回以上陽性) から構成されている。MAC は遅発育性 (集落形成に約 2 週間が必要) であり、細菌学的所見 (喀痰培養: 2 回以上陽性) を満足するため、MAC 感染症の確定診断に約 1 か月が必要となる。

この血清診断キットは MAC 特異的細胞壁抗原 (GPL) を用い、特異的血清 IgA 抗体応答を指標としている。日本国内の多施設共同研究による性能評価では感度 (84%)、特異度 (100%)、迅速性 (所要時間: 3 時間) など、高い有用性を示している。しかし、宿主抗体応答は人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。

台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91%であった。この成績は日本国内の多施設共同研究による性能評価に比し、特に、感度 (日本: 84%や米国: 77%) が低下していた。この原因として、台湾では GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌感染症が高頻度であること、本調査での活動性肺 MAC 感染症患者に免疫不全患者が比較的多い (32%) 大学病院で実施されたことが示唆された。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であったといえる。

今後の課題として、台湾の多施設共同研究 (市中病院を含む) によるキットの性能評価、カットオフ値の検討や GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum* など) 感染症の感度・特異度の解析を進め、台湾における血清診断キットの有用性を最終的に検証することなどが挙げられる。

## E. 結論

- 台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shu, C.C.\*, Ato, M.\*, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., Kobayashi, K., Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (\*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work). 2013. Sero-diagnosis of Mycobacterium avium complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan. PLoS One 8(11): e80473.
- 2) Fukuda, T.\*, Matsumura, T.\*, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, Kinoshita T, Y.S. Morita (\*T.F. and T.M. contributed equally to this work). 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 4(1):e00472-12.
- 3) Kitada, S., A. Levin, M. Hiserote, R. J. Harbeck, C. A. Czaja, G. Huitt, S. H. Kasperbauer, and C. L. Daley. 2013. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease in the United States. Eur. Respir. J. 42: 454-460.

### 2. 学会発表 特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

## **Serodiagnosis of active *Mycobacterium avium* complex disease in Taiwan**

**Manabu ATO  
Takayuki MATSUMURA  
Department of Immunology  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan**

**Sohkichi MATSUMOTO  
Department of Bacteriology  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan**

**Ryoji MAEKURA  
Seigo KITADA  
National Hospital Organization Toneyama Hospital, Osaka, Japan**

**Ruwen JOU  
Centers for Disease Control, Taipei, Taiwan**

**Jann-Yuan WANG  
National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan**

Diagnosis of active *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease (MAC-PD) is complicated and time-consuming, because MAC-PD is diagnosed according to the guidelines set forth by the American Thoracic Society 2007, which include clinical and microbiological criteria. A multicenter study from Japan reported the usefulness of a serodiagnostic test to determine serum IgA antibodies against mycobacterial glycopeptidolipid (GPL) core for diagnosing MAC-PD proven by sputum culture (sensitivity: 84%, specificity: 100%) within a few hours. The objective of this study was to evaluate the usefulness of the test in similar patients in Taiwan. Fifty-seven patients with MAC-LD, 11 with MAC contamination, 13 *M. kansasii*-LD, 26 LD due to rapidly-growing mycobacteria (RGM), 48 pulmonary tuberculosis, and 42 household contacts of patients with TB were enrolled into the study at National Taiwan University Hospital. Serum GPL core IgA antibody levels were measured with an enzyme immunoassay kit, and routine clinical evaluations were performed. The sensitivity and specificity (cut off point=0.73 U/mL) of the serodiagnostic test for diagnosing active MAC-PD were 61% and 91%, respectively. The results were lower when compared to previous reports, perhaps due to high proportion of immune-compromized patients in active MAC-PD and RGD-PD patients. We conclude that measurement of serum anti-MAC-GPL IgA level is useful for the diagnosis of MAC-LD in Taiwan.

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「アジアの感染症  
担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」）

(H23-新興-指定-020)

分担研究報告書

### ハンセン病の病原性と薬剤耐性に関する日台共同研究

研究分担者	甲斐 雅規	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 感染制御部 第3室長
研究協力者	牧野 正彦	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 感染制御部 部長
研究協力者	前田 百美	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 感染制御部 主任研究官
研究協力者	中田 登	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 感染制御部 主任研究官

研究要旨 ハンセン病の血清診断法の開発と評価及び起因菌であるらい菌の薬剤耐性に関する遺伝子変異の検出を実施してきたが、本年はらい菌の薬剤耐性の検出に新しい簡易遺伝子変異検出法（Hp-rPCR 法）を検討した。Hp-rPCR 法で9カ所の異なる変異を同時検出するものでコントロール DNA を用いて良好な結果を得たことから、台湾サンプルのうち *folP1* 遺伝子に変異のあった NTC004 について検討した。DNA 量が非常に少ないこと及び夾雑物の存在が多いという予想から、感度を上げ、夾雑物を除去するために、サンプル DNA を最初にマルチプレックス PCR にかき、標的遺伝子 *folP1*, *rpoB*, *gyrA* を増幅してから Hp-rPCR 法で変異検出を試みた結果、*rpoB*, *gyrA* では耐性変異はなかったものの判定することができたが、*folP1* ではこれまで通常のシーケンス法で確認された耐性変異を Hp-rPCR 法においても判定できた。

#### A. 研究目的

ハンセン病対策は世界保健機関（WHO）が1981年より推奨してきた多剤併用療法が効を奏して感染者の発症数は激減してきた。しかし、今なお世界の登録患者数及び新患発症数は約20万人を数え、最近では新患発生の減少傾向も見られなくなっているのが現状である。また薬剤耐性菌の関与が疑われている再燃や再発などの難治例も無視できない状況である。多くの東南アジア諸国は登録患者の数値ではハンセン病流行国としての登録からは外れたものの、未だにインド、ミャンマー、インドネシア、フィリピン、ベトナムなどでは患者の多い地域が存在し、それぞれの国全体の感染症対策においてもまだ重要な対象感染症となっている。この現状を踏まえ、新患数を減少させ、さらには難治性ハンセン病を治療するためには、ハンセン病の早期診断、治療経

過のモニタリング、薬剤耐性菌の調査、発生源となりうる感染者の発見と感染予防、発症前予防などが必要と考えられる。台湾との協力研究では第1に、我々がこれまで確立してきたハンセン病の血清診断法を用い台湾のハンセン病患者由来血清の試験を実施してきた。また第2に、各国から報告が散見される薬剤耐性菌調査を台湾の患者由来 DNA で実施してきた。第3に、薬剤耐性の存在が疑われる患者由来のらい菌における遺伝子変異が実際に耐性をもたらすという直接的な証拠を得るため、速発育性抗酸菌であるスメグマ菌（*M. smegmatis*）にらい菌の耐性関連遺伝子を入れ、その薬剤に対する影響をみることで証明するという方法を台湾で得られた耐性変異に応用した。これまでの結果に加え、今回はこれら耐性変異の迅速検出法を開発し検討を加えた。

## B. 研究方法

耐性変異の迅速検出のために今回用いた方法は結核菌の薬剤耐性変異検出のために以前報告された方法で (M. H. Hazbon and D. Alland, J. Clin. Microbiol 42:1236-1242, 2004)、その原理を図 1 に示す。基本的にはリアルタイム PCR 法を用いている。PCR 産物である 2 本鎖 DNA がサイバークリーンで蛍光標識される反応系を用い、ABI の Step One Plus を用いて測定を行った。Forward Primer はそれ自身が構造的にヘアピンを形成するような配列にするのが特徴である。Reverse Primer は通常の PCR に使用するような配列にする。Forward Primer の 3' 末端の塩基が変異の有無を調べる標的部位にくるように設計する。その標的部位の塩基が 4 種の塩基 G, A, T, C のいずれかを知るために、その 3' 末端が異なる 4 つの塩基となる 4 つの Forward Primer を作成する。ここでは本法を Hp-rPCR (Hairpin primer real time PCR) 法と呼ぶ。それぞれを Reverse Primer と PCR を行い、いずれとの PCR がもっとも効率良く PCR 産物を産生するかを見ることでサンプルの持つその標的部位の塩基を決定し変異の有無を判定するものである。その効率の判定のために、増幅曲線が立ち上がった時にスレッシュホールドライン (閾値線) と交差するサイクル数を示す Threshold Cycle (Ct) 値により数値的に判定する。反応は、サイバークリーンマスターミックス 5  $\mu$ l、5  $\mu$  M forward primer 1  $\mu$ l、5  $\mu$  M Reverse primer 1  $\mu$ l、テンプレート DNA X  $\mu$ l で滅菌蒸留水で液量を 10  $\mu$ l とする。専用の 96-well プレートを用い、各反応は 3 well ずつ (triplicate) 行った。反応条件は、98°C, 10 秒、61°C, 10 秒、68°C, 10 秒で 45 サイクル行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は動物実験を含まない。分担研究、共同研究者の所属する両施設の倫理委員会の承認を得て行った。検体の採取は通常の菌検査において実施される方法であり、その方法は

特段の侵襲性を有するものではなく、菌の解析は患者のプライバシーには抵触しない。患者に対しては目的を説明し、同意が得られた場合にのみ検体の採取を実施した。

## C. 研究結果

まず、コントロールとしてらい菌 Thai-53 と Zensho-2 からゲノム DNA を抽出し、それぞれを薬剤感受性と耐性のコントロールのテンプレート DNA とし、3 wells ずつの反応 (triplicate) を行った。図 2 は Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位コドンの 2 番目の塩基を標的とした Hp-rPCR 法を示した。Forward プライマーの 3' 末端が T のプライマーの Ct 値が最も小さいことから Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位のコドンは CTC であり、ダブソン耐性変異であることが確認できた。同様に Thai-53 を用いて行った *folP1* 遺伝子 3 カ所の結果は 53 位の 1 番目の塩基は A、2 番目は C、そして 55 位の 2 番目が C であり、確かに感受性菌での配列であることが確認できた。*rpoB* 及び *gyrA* の結果は示していないが、いずれも本法により標的部位の塩基の判定ができた。

表 1

Sample	Type	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	MB	wt	wt	wt
NTU002	MB	wt	wt	wt
NTU003	MB	wt	wt	wt
NTU004	MB	T53R★	wt	wt
NTU006	MB	NA	NA	NR
NTU007	MB	wt	NA	NA
NTU011	MB	wt	NA	NA
NTU012	PB	T53I	wt	NA
NTU013	PB	wt	wt	NR

★T53R: *folP1* 遺伝子の 53 位トレオニンがアルギニンに変異

次に以前報告した表 1 にあるように耐性変異を示した NTU004 を用い、本法を試みた。最初は臨床検体から得た DNA であることから非常に DNA が少なくクリアな結果が得られなかったため、マルチプレックス PCR 法を行い、その後 Hp-rPCR 法を行うこととした。その結果、クリアな結果を得ることができた。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じていたことはこれまでに確認されてい

## T53I-T

A efficient

inefficient

28

る。この変異によってダブソン耐性をもたらすことが推察された。

## T53I-G

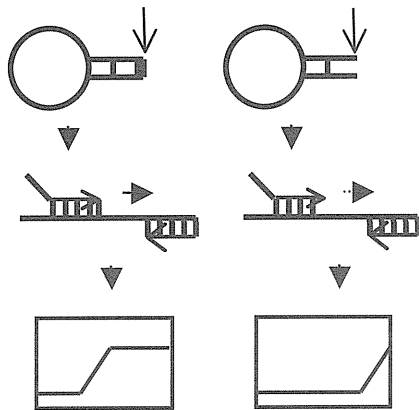
G

25

図 1 Hp-rPCR(Hairpin-primer realtime PCR)法

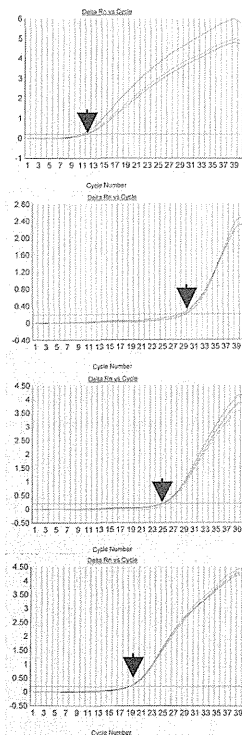
C

19



当然のことながら、Hp-rPCR 法では 53 位の 2 番目の塩基については結果を得ることはできたが、プライマーの設定のない 3 番目の塩基については確認できなかった。

図 2. *folP1* 遺伝子 55 位のコドン 2 番目の塩基 C の変異を持つらい菌 Zensho-2



数字は Ct 値

## D. 考察

Hp-rPCR 法が標的である 9 カ所の変異の有無を確実に判定できることを、コントロールの菌においても臨床由来の菌においても可能であることが明らかとなった。DNA 回収が非常に悪いことが多い臨床検体においてもマルチプレックス PCR 法との併用により非常に高感度に判定することができた。マルチプレックス PCR 法と Hp-rPCR 法を併用した場合に要した時間は DNA 抽出から判定までで、約 5 時間であり、迅速性についても良好な結果だったと考えられる。NTU004 の持つ ACC から AGA の変異はトレオニンからアルギニンの変異であるが、Hp-rPCR 法で判定されるのは 2 番目の C が G であっただけであることから、ACC から AGC への変異の可能性もありになり、その場合アミノ酸の変異はトレオニンからセリンへの変異になる。この場合の変異と耐性の関係は証明されていないので、厳密には判定に間違いを冒す可能性があることになる。これは今後の課題であるが、現実には AGC という変異は臨床株で見つかっておらず、おそらく物理学的な分子間エネルギーの関係で 2 番目の C から G への変異は 3 番目の C から A への変異を伴うのかもしれない。

## E. 結論

Hp-rPCR 法をらい菌の耐性変異検出のために利用することが可能であることが証明出来た。マルチプレックス PCR 法との併用で迅速・簡便に多数標的箇所の同時判定ができた。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) M. Kai, N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda and M. Makino. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. *Infection, Genetics and Evolution* Vol. 19, 200-204, 2013.
- 2) 甲斐雅規. Hp-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. 日本ハンセン病学会雑誌, 2014 年 (in press)

## 2. 学会発表



- 1) P. S. Rosa, S. M. Diório, A. F. F. Belone, I. M.F.D. Baptista, P. N. Suffys, L. R V Fachin, L. M. Trino, B. G. C. Sartori, L. R. De Lamano, M. I. de Araujo, W. F. B. Delanina, F. B. Marques, S. Ura, C. T. Soares, M. B. Xavier, M. T. Mira, M. O. Moraes, M. Matsuoka, M. Kai, M. C. L. Virmond. Evidence of active transmission of drug resistant *Mycobacterium leprae* strain in Brazil. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 2) Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 3) N. Nakata, M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of *Mycobacterium leprae* genes and drug resistance using cultivable mycobacteria. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 4) M. Kai<sup>a</sup>, N. Nakata<sup>a</sup>, G. T. Chae<sup>b</sup>, P. Saunderson<sup>c</sup>, A. A. Maghanoy<sup>c</sup>, M. F. Balagon<sup>c</sup>, M. Matsuoka<sup>a</sup>, T. Sekizuka<sup>d</sup>, M. Kuroda<sup>d</sup>, and M. Makino. Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 5) 天児和暢, 飯田健一郎, 斉藤光正, 甲斐雅規, 松岡正典, 吉田真一: ライ菌の培養、マウス組織抽出物・ヒト血漿の効果。第86回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013年5月
  - 6) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井 徹、甲斐雅規、前田百美、牧野正彦: *Mycobacterium leprae* のメタボローム解析。第86回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013年5月
  - 7) 中田登、甲斐雅規: 培養可能抗酸菌を用いたらい菌薬剤耐性変異解析法のフルオロキノロン耐性変異解析への応用。第86回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013年5月
  - 8) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦: SNPs の解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴。第86回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013年5月
  - 9) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular detection of drug resistant *M. leprae* and genotyping of *M. leprae*. The 10<sup>th</sup> Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases & Cooperative Project Reports. Tokyo, Sep. 12-13. 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
  1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他 著書  
なし

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究 (H23-新興-指定-020 )

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部  
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部  
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

カウンターパート : Taiwan CDC, Ms. Fang-tzy Wu.

研究要旨： 台湾における 2010 年から 2012 年の Norovirus 感染患者便検体約 300 検体より検出された GII.4, GII.2, GII.3 流行株の ORF1 から genome end にかけての塩基配列解析を行い、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに適合した Universal primer RT-PCR システムを構築した。TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の進化速度（負の淘汰）であり、これまでに報告された速度の約 1/4 の進化速度であることが示唆された。

Abstract:

We established universal primer set and long RT-PCR system to analyze norovirus genotype according to a unified norovirus nomenclature and genotyping. New long distance RT-PCR system with UniKY primer set could detect all of the norovirus genotypes that were included previously reported norovirus positive stool panel. To study norovirus evolution in human body, norovirus positive stool samples that were serially sampled from same patient were analyzed with next generation sequencing system (NGS). Norovirus evolution speed that showed 0.48 nt /day/genome was one fourth slower than previously reported.

A. 研究目的

台湾における 2010 年から 2012 年の台湾に

おける 2010 年から 2012 年の Norovirus 感染患者便検体約 300 検体より検出された GII.4, GII.2, GII.3 流行株の ORF1 から genome end にかけての塩基配列解析を行い、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに適合した Universal primer RT-PCR システムを構築する。また、TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を用いて研究する。

## B. 研究方法

### 1. 材料と方法

#### <NoV 陽性検体>

台湾 CDC (TCDC) によって 2010 年から 2011 年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体を NoV、SaV のコンベンショナルな RT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を呈した糞便検体 169 検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990 年から 2000 年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体 132 検体を新手法の評価用レファレンス NoV 陽性糞便パネルとして用いた。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべての genotype の約 90% をカバーする糞便レファレンスパネルとして管理運用している。

さらに、NoV の固体内進化を調べるため、NoV 感染患者 A - P の 15 名から経時的にサンプリングされた便検体を、次世代シーケンスシステム: NGS (イルミナ MiSeq) による解析に用いた。

#### <コンベンショナル RT-PCR>

NoV の検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告された G1SKF & R, G2SKF & R プライマーセットを用いた RT-PCR を行った。

#### <Real-time RT-PCR>

NoV の RNA ゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられている COG primer set と RING probe を用いた real-time RT-PCR を用いた。本方法で得られた RNA 定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIA を評価した。

#### <Universal primer RT-PCR>

ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに必要とする領域を増幅可能な全ての NoV に適合した第 3 世代 Universal primer set をデザインした。HuNoV 全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1 にコードされたプロテアーゼ切断モチーフ付近に、新規 Universal primer set (Uni3KY primers) を設計した。設計した新規 primer set と、Takara PrimeStar GXL を用いて約 4.5 kb の long distance RT-PCR を実施し、PCR amplicons が得られなかった場合、Uni1KY primers を

用いた nested PCR を実施した。1<sup>st</sup> step RT-PCR amplicon, 2<sup>nd</sup> step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2 (VP1) 全長をカバーする。

#### <塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

#### <NGS による塩基配列解析>

便検体から抽出した RNA より、NEB 社の NEBnext Ultra キットを用いて、cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行い NoV genome 上の核酸変異、アミノ酸変異を検出した。

#### <分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

### C. 研究結果・考察

#### 1. 各種 NoV 検出法と Universal primer RT-PCR の比較

TCDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII

混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GII 単独感染に関しては完全にコンベンショナル RT-PCR, standard real-time RT-PCR と同様であった。第 3 世代 UniKY series primer set を用いた場合も、同等の結果であった。しかし、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7/39 (18%) と極めて低かった。陰性を示した検体は、10<sup>4</sup> copies /uL 以下の RNA titer であった。第 3 世代 UniKY series primer set を用いた場合も、同等の結果となり、今回 TCDC より持ち込まれた GI サンプルは、何らかの原因でウイルス粒子が壊れ、ウイルス RNA が分解したか、10<sup>4</sup> copies /uL 以下の RNA titer を示す低濃度の検体であったことが明らかになった。

TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。加えて、Super rapid RT-PCR で検出可能であった検体は、Universal primer RT-PCR 検出系で 100% 検出可能であった。つまり、Super rapid RT-PCR にて陽性を示した検体は、Universal primer RT-PCR で増幅し、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が可能であることが明らかとなった。

NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、Universal