

年の百日咳流行時に Prn 欠損株が減少したが、この流行時には Prn を発現する MT27d 株の一時的な増加が認められている (Miyaji et al., PLOS ONE, 2013)。米国では Prn 欠損株が増加傾向にあり、2012 年のワシントン州の流行では臨床分離株の 73%を占めた。Prn は百日せきワクチンの防御抗原であること、さらに欧米では精製百日せきワクチン導入後に欠損株が出現したことから、Prn 欠損株はワクチンを回避するために出現した可能性が論議されている。ただし、Prn 欠損とワクチンの関係はいまだ不明であり、Prn 欠損株の出現理由は明らかとなっていない。Prn 欠損株については継続した監視が必要であり、平成 26 年度も引き続き調査を行う予定である。

#### E. 結論

百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、遺伝子検査キットを始めとするレファレンス関係の配布・整備を行った。さらに、百日咳流行株における Prn 欠損状況を調査し、わが国でも欧米と同様に Prn 欠損株が流行していることを確認した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Miyaji Y, Otsuka N, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. PLOS ONE. 8(10):e77165, 2013.
2. 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 新興・

再興感染症 up to date. 化学療法の領域 2013 年増刊号. p71-79, 医薬ジャーナル社, 大阪.

3. 蒲地一成. 百日咳検査の使い方. SRL 宝函. p41-43, vol. 34, No. 3, 2013, エスアールエル, 東京.

学会発表

国際学会

1. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10<sup>th</sup> Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.

国内学会

1. 勝川千尋, 梅田薫, 河原隆二, 蒲地一成. 百日咳の診断における培養検査と遺伝子検査の有用性の検討. 第 87 回日本細菌学会総会. 3 月 26-28 日, 2014 年, 東京
2. 勝川千尋, 榎引千恵子, 西戸温美, 蒲地一成. 百日咳の細菌学的検査精度向上に関する多方面からの検討. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 2 月 1-2 日, 2014 年, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

百日咳の血清診断法 (特願2013-77138, 平成25年4月出願)

実用新案登録

該当なし

その他

特記事項なし

表 1. 百日咳レファレンスセンター（平成25年度）

北海道・東北・新潟ブロック	秋田県健康環境センター
関東・甲・信・静ブロック	東京都健康安全研究センター 千葉県衛生研究所
東海・北陸ブロック	三重県保健環境研究所
近畿ブロック	大阪市立環境科学研究所
中国・四国ブロック	愛媛県立衛生環境研究所 岡山県環境保健センター 山口県環境保健センター
九州ブロック	福岡県保健環境研究所 熊本県保健環境科学研究所

表 2. 平成25年度のレファレンス関係の配布実績（平成26年1月現在）

レファレンス	地方衛生研究所		計
	レファレンスセンター	その他	
<i>Bordetella holmesii</i> LAMPキット	2	6	8
4PlexリアルタイムPCRキット	1	3	4
陽性コント ロールDNA	0	1	1
百日咳菌 百日咳類縁菌	0	8	8
計	3	18	21

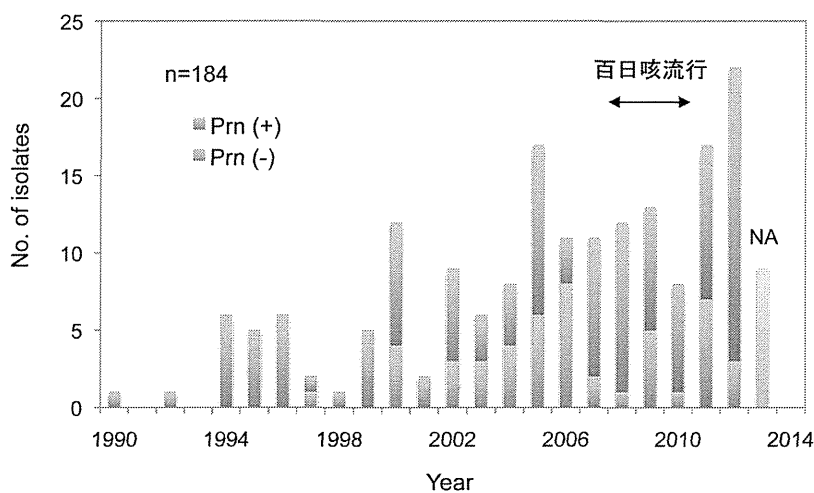


図 1. 日本におけるPrn欠損株の分離状況（1990-2014年）  
2008-2010年に百日咳流行が発生し、Prn欠損株は一時的に減少傾向を示した。  
なお、2013年の臨床分離株（9株）は現在解析中である

### 結核菌型別分析における精度保証

研究分担者 御手洗 聡 公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部部長  
研究協力者 前田 伸司 公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌結核菌情報科

#### 研究要旨

結核菌の型別標準法は、IS6110 制限酵素断片長多型（RFLP）分析法から反復配列多型（VNTR）分析法に代わりつつある。アンケート調査の結果、日本国内では 41 箇所の衛生研究所が結核の型別分析を行っており、その内の 92%の施設が型別法として VNTR 法を利用している。これまで結核菌検査に関するサポートとして、希望する施設に VNTR 分析用のプライマーセットと 4 種類の VNTR 分析精度管理用ゲノム DNA の配布を行ってきた。この方法では、DNA 送付の際、各ローカスの分析結果リストを同封して自己確認を行ってもらい、結果の報告は求めていなかった。本研究では、新たに複数種類の結核菌ゲノム DNA を準備して型別分析のための精度保証用パネルを作成した。このパネルを希望施設に配布し、結果を報告してもらうことで客観的に分析精度の確認を行う予定である。同じ方法やルールで解析を行い、それを確認することで多施設間の正確なデータ比較が直接可能となる。将来的に分離結核菌の全数型別分析ができれば、結核感染実態の把握等対策に利用できると思われる。

#### A. 研究目的

日本国内における平成 24 年 1 月 1 日～12 月 31 日間の結核罹患率（人口 10 万対の新規登録患者数）は 16.7 で、年々低下傾向である。しかし、米国（3.4）の 4.9 倍という現状である。患者年齢構成は、再発例が多いと考えられる 70 歳以上の高齢者が全結核患者の 55.6%を占めている。また、登録された患者についての保健所等の接触者調査が精力的に行われており、結核感染の広がりを防止するための対策が進められている。しかし、毎年、集団感染事例の報告があり平成 24 年は、事業所（24 例）、病院（院内感染 9 例）、社会福祉施設（5 例）、学校（3 例）など合計 49 件が報告されている。接触者検診で大きな集団感染が発見されることがある。このような例では、分離された結核菌の遺伝子型別分析で同一クローンかどうかを調べることで接触者調査の結果を確認することができる。

結核菌の型別分析は、診療・診断に直接結びつ

かないため保険点数もなく衛生検査所等では行われていない。そのため、各都道府県・政令市の衛生研究所で分析することが期待され、環境も整いつつある。これまで、結核研究所では、北京型結核菌を効率よく型別できる VNTR システムの Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) (12)を樹立して報告している。また、レファレンスの費用で反復配列多型（variable number of tandem repeat : VNTR）分析用のプライマーセット（18 座位）を希望する衛生研究所に送付している。JATA(12)-VNTR システムは、北京型結核菌の識別能は若干低いが生型別結果は集団感染事例か否かの判断に利用可能である。また、本分析システムは、特別な装置は必要なく各 PCR 産物の分析にアガロースゲルを用いた電気泳動が利用できるという利点がある。

本研究では、希望する施設にパネルとなる結核菌ゲノム DNA を送付することで JATA(12)だけでなく、VNTR-1982、ETR-A の 2 か所、さらに高識

別能が必要な場合に分析するハイパーバリアブル (HV) の VNTRs-2163a、3232、3820、4120 の 4 か所などの各研究所で実際に利用している座位を分析し報告して頂く予定である。このような方法で VNTR 法による型別分析に関する精度保証を行うことを研究の目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 結核菌株の選択

今まで研究所の VNTR 分析で得られている結果を参考に、特にコピー数に換算することが難しい高分子 PCR 産物が得られる株を含めた結核菌 5 株を選択してゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA はアイソプラント (ニッポンジーン) を用いて既報の結核菌精製プロトコールに従い精製を行った。

### 2. VNTR 分析によるコピー数の確認

送付する結核菌株各ローカスのコピー数の確認を行った。各 PCR 産物は、DNA genetic analyzer (ABI3130)を用いたフラグメント解析あるいはコスモアイ (日立化成株式会社) を用いたキャピラリー電気泳動で分析し、換算表に従ってコピー数に換算し確認を行った。

## C. 結果

### 1. 結核菌 VNTR 分析普及のための活動

結核菌型別法ひとつである VNTR 分析を各地域の衛生研究所に普及するために平成 22 年度に VNTR 分析用の 18 座位 (36 種類) のプライマーセットを希望する施設に送付した。その後も、各施設の自主的な分析精度管理のために 4 種類のゲノム DNA の配布を行っている。平成 25 年度は、2 か所に送付した。また、本年度はなかったが、VNTR 法の陽性コントロールとして使用する H37Rv 株 DNA の分与も行っている。

### 2. 結核菌遺伝子解析 (タイピング) に関するアンケート調査

アンケート調査により、結核菌型別 (タイピング) を実施しているか尋ねたところ、回答のあった 79 施設 (100%) の内、41 施設では結核菌を扱っており遺伝子型別等が可能、8 施設は現在扱っていないが予定はある (6 施設は 2013 年度中に開

始、2 施設は準備中)、30 施設は扱っていないという回答だった。利用している型別法としては、92%が VNTR 法による型別法で、ついで 26%が IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法だった。

### 3. 精度保証用ゲノム DNA パネルの準備

本精度保証のパネルテストでは、コピー数を調べるローサイとして JATA(12)の 12 か所、それ以外にも Supply(24)対応ローサイ、HV ローサイなどもあり、30 か所にもなる。分析ローサイはそれぞれの施設に任せるが、最低でも JATA(12)の 12 か所なので、10 株送ると施設での負担が大きくなる、そのため、今回は 5 株の送付とした。また、日本国内では、北京型結核菌が全結核菌の 70~80%を占めていることが報告されている。そのため、各衛生研究所で分析を依頼される株は、ほとんどの例が北京型と考えられる。このことから北京型結核菌を多く含むパネルとした。今後、希望施設に配布して結果の比較を行う予定である。

## D. 考察

扱いが難しい菌であるにも関わらず、79 箇所の衛生研究所の中で 41 か所の施設で扱うことが可能で型別も行われていることが明らかになった。また、遺伝子型別法としては、41 施設のうち 92%が VNTR 法による型別法が採用されていることから、VNTR 法についての精度保証パネルを作成して配布すべきということが確認できた。

共通のルールでミニサテライト DNA のコピー数の算出することで異なる施設間での結核菌型別結果比較が容易に実施できる。さらに、実際にパネルテストで同じ結果が得られることが確認できれば、離れた地域間でもデータの比較が直接可能になる。

今後、新規登録患者数が低下することで結核菌の全数型別も可能となれば、これらの手法で感染経路の推定もできるようになると考えられる。

## E. 結論

結核菌 VNTR 分析用の精度保証用パネルを作成して実際に分析を行っている衛生研究所に配布することで、これまで独自に行われている VNTR 分析に関する精度保証を進める。異なる施

設間で型別結果を直接比較することができるようになり、結核感染動態の把握等、結核対策に利用できる。

#### F. 健康危惧情報

本研究においては、結核菌の感染の危険があると考えられた。全ての結核菌（生菌）の取り扱いには感染症法及びバイオハザード指針に従ってBSL3 レベルの実験室内で安全キャビネットを用いて行った。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

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）  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

動物由来感染症レファレンスセンター 平成25年度活動報告

炭疽菌DNAのPCR検査における検出限界の算定

研究分担者 森川 茂 獣医科学部長

研究協力者 奥谷晶子 獣医科学部 主任研究官  
井上 智 獣医科学部 第二室長

研究要旨

衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属している 7 カ所の地方衛生研究所の参加協力のもと、平成 25 年度は炭疽菌遺伝子検査で用いる PCR 検査系の検出限界の算定を行った。これは平成 24 年度に「炭疽菌および近縁菌を用いたブラインド・テスト」を行い、参加衛生研究所での PCR 検査系が稼働することを確認した上で、次のステップとして各施設で使用する機器における当該検査系の検出限界の算定を検証する必要性があげられたため、本年度において実施したものである。本年度は 6 カ所の地方衛生研究所に検査系の検証の協力をいただき、全ての施設において炭疽菌芽胞換算で 1 から 100 個あたりの検出限界を保持していることが明らかとなった。また、狂犬病のレファレンス機能を向上させるために 17 地方衛生研究所とレファレンスネットワークを構築して狂犬病の検査手法に対するブラインドテストを準備している。

A. 研究目的

衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属している 7 カ所の地方衛生研究所において、平成 24 年度に「炭疽菌および近縁菌を用いたブラインド・テスト」を行い、全ての参加衛生研究所において PCR 検査系が稼働することを確認した。今年度は、各施設で使用する機器における当該 PCR 検査系の検出限界の算定を検証する必要性があげられたため、炭疽菌芽胞液から抽出した DNA 溶液の 10 倍階段希釈液を送付し各施設での検出限界を調査し、検査成績のまとめを行った。

B. 研究方法

1. 炭疽菌芽胞液からの DNA 調整

供試菌株について。臨床分離株 (BA103 )

を使用した。病原性プラスミド pXO1(pag 遺伝子をコード)および pXO2(cap 遺伝子をコード)の保持を確認済みである。-80℃芽胞液ストックを LB ブロスに懸濁して、37℃一晩好気培養した。芽胞数を計測するために培養液から 10 倍階段希釈液( $10^{-1}$  から  $10^{-5}$ )を作成し LB 寒天培地に塗抹 37℃一晩好気培養後、コロニー数を計測した。同じ培養液を 50ml×2 本の LB ブロスに 100 分の 1 量(500 $\mu$ L)添加し、37℃一晩好気培養を行い DNA 抽出した。

DNA 抽出は培養液 50ml×2 本の遠心後のペレットに Lysis Buffer(0.2% SDS、1.2% Triton、2mM EDTA pH 8.0、20mM Tris HCl pH8.0)、lysozyme 処理、proteinase K 処理後、フェノール・クロロフォルム処理を 2 回を行い、エタノール沈殿

で精製した。

処理後の DNA 溶液に感染性の芽胞が混入していないことを確認するため DNA 溶液 10 $\mu$ L を羊血液寒天培地にスポットして 37°C で 7 日間培養し、コロニーが発育しないことを確認した。

## 2. 低濃度 DNA 溶液の安定性の検証

抽出した DNA は TE buffer に懸濁した。これを元液として 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-8</sup> 階段希釈液を作成して検査用 DNA とした。低濃度の DNA の分解あるいはチューブへの吸着による減衰を防ぐため、キャリア DNA として断片化鮭精子 DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ L 相当) を加えて -20°C で 7 日間保管後の DNA を用意した。DNA を template として pag 遺伝子および cap 遺伝子の検出 PCR を病原性検出マニュアルのプロトコール通りに行い、各 DNA の安定性を確認した。

## 3. 参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめ

参加衛生研究所へは各希釈 DNA 溶液、PCR 用プライマー、および陽性対照 DNA を梱包し、冷蔵宅急便にて送付した。各施設で行った PCR の結果については成績を記載したワードファイルの作成とメール送信を依頼した。

## C. 研究結果

### 1. 炭疽菌芽胞液からの DNA 調整

元液 DNA 10 $\mu$ L あたりの想定芽胞数は、10<sup>7</sup> 個相当となった。よって、10<sup>6</sup> 個から 0.1 個相当の DNA 溶液希釈列 (10<sup>-1</sup> から 10<sup>-8</sup> 階段希釈) が作成された。

### 2. 低濃度 DNA 溶液の安定性の検証

断片化鮭精子 DNA を加えた DNA 希釈列

の方が、加えないものより 7 日間後の PCR 増幅結果が安定しており、pag 遺伝子では 10<sup>-7</sup> 希釈 (芽胞 1 個相当)、cap 遺伝子では 10<sup>-6</sup> 希釈 (芽胞 10 個相当) まで検出できることを確認した。

## 3. 参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめ

各施設での成績は一覧にまとめた (表 1)。検出限界の濃度は施設間で差がみられた。pag 遺伝子、cap 遺伝子ともに施設により 1 個から 100 個の検出限界を示した。また、pag 遺伝子をコードする pXO1 と cap 遺伝子をコードする pXO2 で検出限界に差がみられた。

## D. 考察

pag 遺伝子をコードする pXO1 と cap 遺伝子をコードする pXO2 では一細胞あたりのプラスミド・コピー数が異なり、pXO1 の方が 3 から 30 倍多いという報告がある。遺伝子間の検出感度の差はこれらのコピー数に由来することが考えられる。しかしながら、conventional PCR 検査系では低濃度 DNA での増幅に影響する他の要因 (例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い) も考えられる。

今回、施設間で検出限界濃度の差が認められたものの、炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には非常に多くの炭疽菌 (通常 10<sup>6</sup> CFU/ml 以上) が存在していることからこれらの検体に関しては、今回検証された検出限界の検査系で検査は可能であると考える。過去に生物テロで使われた芽胞粉末 (いわゆる白い粉) の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、First screening としての PCR 検査系としては十分な検出限界を有していると考え

える。

#### E. 結論

今回参加した各地方衛生研究所の PCR 検査系で示された検出限界は、現在想定される炭疽菌検体の検出に有効な範囲であることが示された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

衛生微生物協議会 レファレンスセンター報告「動物由来感染症」。平成 24 年 7 月。名古屋

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし



表1 炭疽菌pag遺伝子およびcap遺伝子 検出限界算定のためのPCR増幅結果一覧

(山形県衛生研究所、愛知県衛生研究所、京都府保健環境研究所、広島県立総合技術研究所保健環境センター、徳島県立保健製薬環境センター、長崎県環境保健研究センターの参加)

		pag遺伝子増幅結果						
		山形	愛知	徳島	京都		広島	長崎
		50℃	55℃	55℃	52℃	55℃	55℃	55℃
1	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12ng/uL	+	+	+	+		+	+
2	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2ng/uL	+	+	+	+		+	+
3	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120pg/uL	+	+	+	+		+	+
4	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12pg/uL	+	+	+	+		+	+
5	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2pg/uL	+	+	+	+		+	+
6	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120fg/uL	+	+	-	+		+	+
7	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12fg/uL	+	-	-	-		-	-
8	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2fg/uL	-	-	-	-		-	-
7	陽性対照DNA	+	+	+	+		+	+
8	陰性対照	-	-	-	-		-	-
		cap遺伝子増幅結果						
		山形	愛知	徳島	京都		広島	長崎
		50℃	55℃	55℃	52℃	55℃	55℃	55℃
1	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12ng/uL	+	+	+	+		+	+
2	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2ng/uL	+	+	+	+		+	+
3	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120pg/uL	+	+	+	+		+	+
4	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12pg/uL	+	+	+	+		+	+
5	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2pg/uL	+	+	+	+		+	+
6	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 120fg/uL	+	+	-	+		+	+
7	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 12fg/uL	-	-	-	-		-	-
8	<i>Bacillus anthracis</i> 臨床分離株 1.2fg/uL	-	-	-	-		-	-
7	陽性対照DNA	+	+	+	+		+	+
8	陰性対照	-	-	-	-		-	-

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）  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

HIV関連感染症

研究分担者	俣野哲朗	国立感染症研究所	エイズ研究センター長
研究協力者	吉村和久	国立感染症研究所	エイズ研究センター室長
	草川 茂	国立感染症研究所	エイズ研究センター主任研究官
	西澤雅子	国立感染症研究所	エイズ研究センター研究員
	松岡佐織	国立感染症研究所	エイズ研究センター研究員

研究要旨 地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を進め、国内HIV感染動向・検査状況についての情報共有およびHIV検査技術・体制の維持・強化に向けた取組みを推進した。

A. 研究目的

本邦のHIV感染者数とエイズ患者数を合わせた年間新規報告件数は、2007年以降約1500件で推移しており、2012年には累積報告件数が2万件を超えた（エイズ動向委員会）。新規報告件数の約30%はエイズ患者としての報告、つまりエイズ発症によりHIV感染が判明した例であることから、実際のHIV感染者数は報告件数を大きく上回っていると推察され、早期発見が十分になされている状況ではないと考えられる。したがってHIV検査推進は重要課題である。

HIV検査推進にあたっては、検査技術の維持・向上および検査体制の強化が必要となる。特にHIVでは、その多様性・変化に対応した検査技術の更新が重要である。そこで本研究では、本邦のHIV検査状況を把握するとともに、検査技術・体制の強化に結びつけることを目的とし、地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を進めた。

B. 研究方法

2013年7月の衛生微生物技術協議会第34回研究会（名古屋）におけるHIV関連感染症に関する会議で、地方衛生研究所等との協議・議論を進め、その後も適宜、情報交換を行った。また、2013年10月の名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とするHIV技術研修会に協力した。

C. 研究結果

国立病院機構名古屋医療センターおよび神奈川衛生研究所と共同でネットワーク体制を推進し、北海道立衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、横浜市衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、兵庫県立健康生活科学研究所、広島市衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所等の情報交換を行った。特に、HIV感染者・エイズ患者の報告件数、地域・年齢・

感染経路等の分布、疫学的解析結果、薬剤耐性変異株動向、保健所等における検査状況・体制、献血における HIV 陽性者数、検査技術等に関する情報を共有した。これらの情報共有は、病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2012 および特集関連情報作成においても有用であった。名古屋医療センター主催の地方衛生研究所等の検査従事者を対象とする HIV 技術研修会に協力し、検査技術の維持・向上に努めた。

#### D. 考察

HIV の多様性は大きく、ウイルスゲノム変化に持続的に対応した検査技術の更新は重要である。本ネットワーク体制に基づく情報共有ならびに技術研修等による検査体制の維持・強化は、検査技術の維持・向上に極めて重要な役割を担っていると考えられる。なお、本ネットワーク体制構築において、国立病院機構名古屋医療センターおよび神奈川衛生研究所等の貢献は大きい。

#### E. 結論

地方衛生研究所等とのネットワーク体制構築・維持を推進し、国内 HIV 感染動向・検査状況・技術についての情報共有および HIV 検査技術強化に貢献した。このネットワーク体制は、病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 9 月号の特集 HIV/AIDS 2012 および特集関連情報作成にも貢献した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 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）  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

「新しい48型関連組換え型アデノウイルスの結膜炎患者からの検出・同定」

研究分担者	藤本嗣人	国立感染症研究所 感染症疫学センター
研究協力者	山根翔太郎	北海道大学 大学院情報研究科
	小川知子	千葉県衛生研究所
	花岡 希	国立感染症研究所 感染症疫学センター
	小倉 惇	千葉県衛生研究所
	堀田千恵美	〃
	仁和 岳史	〃
	千葉 彌幸	永吉の眼科
	Gabriel Gonzalez	北海道大学 大学院情報研究科
	青木 功喜	〃
	小柳 香奈子	〃
	渡邊 日出海	〃

### 研究要旨

2007年以降に53型以降の新しいヒトアデノウイルス(HAdV)ジェノタイプ(型)が報告され(それ以前の51型までは中和反応による血清型であった)流行している所以我々はレファレンス活動を強化している。特にD種アデノウイルス(HAdV-D)においては新しい型の報告が多い。本研究で我々は日本で検出されたことがないHAdV-48関連ウイルス(HAdV\_Chiba\_E086/2012)の進化的特徴を報告する。HAdV\_Chiba\_E086/2012は日本の結膜炎患者の結膜ぬぐい液から分離された。ウイルス遺伝子を抽出してサンガー法で完全長の塩基配列を決定して既知のD種アデノウイルスとシークエンスアライメントした。HAdV\_Chiba\_E086/2012のペントンベース(P)、ヘキソン(H)、ファイバー(F)遺伝子および領域について系統樹を作成して解析した。その結果、P、H、FおよびE3についてそれぞれ65型、48型、60型および22型とそれぞれ98%、95%および98%の相同性を持っていた。このことからHAdV\_Chiba\_E086/2012はP65H48F60と定義できるものと考えられた。系統樹解析および組換え解析の結果から、このウイルスは59、65、48、60、22型およびその近縁と思われる型のネステイド組換えにより生じたものと考えられた。

これらの結果からHAdV\_Chiba\_E086/2012は、日本における初の48型関連ウイルスであり、これまで報告されたHAdVの中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。

## A. 研究目的

ヒトアデノウイルス D 種 (HAdV-D) はヒト特異的な唯一の種であり最も多様性がある種であり重症の流行性角結膜炎 (EKC) を引き起こすことで知られる。近年、新しい EKC を引き起こす新しい HAdV-D が検出され、全ゲノム配列による genomotype として報告されている。それまでの中和反応による 51 型までの serotype に加え 52 型以降が全遺伝子配列の決定により定義されてきている。その中で HAdV-53、54 および 56 は日本で EKC の流行を引き起こしている。我々はこれまで日本で報告されたことがない 48 型関連ウイルスを結膜炎患者の結膜ぬぐい液から分離したので、その全ゲノムを解析した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

眼科定点医療機関を受診した 63 歳の結膜炎患者の左眼から 2012 年 4 月 24 日に採取した結膜ぬぐい液から CaCo2 細胞により分離され、A549 細胞を使用して増殖した HAdV\_Chiba\_E086/2012 を用いた。

### 2. 塩基配列の決定

International Nucleotide Sequence Database (INSD) で入手可能な 21 種類の HAdV-D の塩基配列をもとにデザインしたプライマーを用いてサンガー法により完全長の塩基配列を決定した。最初に全塩基を重複してカバーする 23 のセグメントを PCR により増幅した。PCR 増幅産物を Exonuclease I およびアルカリフォスファターゼにより精製したのち、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems) を用いて AB3130xl Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。

我々はシークエンスで得られた波形を調べ、異なったゲノムの混入を示唆する多形がないことを確認した。ゲノムの両端は 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) により決定したすべての波形を phred Phrap により塩基配列の決定 (ベースコール) およびアセンブルした。

### 3. 塩基配列の解析、アノテーション、登録

HAdV\_Chiba\_E086/2012 の塩基配列を HAdV-8 (アクセッション番号 AB448767) と比較してアノテーション (注釈) をつけて DDBJ を通じて INSD にサブミットした。

得られた完全長の塩基配列を 45 種類の HAdV-D ゲノムと比較した。得られた配列を MAFFT version 6 の Iterative Refinement Method algorithm (FFT-NS-I) で解析してマルチプルゲノムアライメント (MGA) を得た。HAdV\_Chiba\_E086/2012 の配列を AB765926 として登録した。

### 4. 組換え解析

得られた MGA を Recombination Detection Program (RDP) (RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics, 26, 2462-2463) を使用して  $p$  値  $< 0.001$  で RDP, Chimaera, BootScan, GENECONV, MaxChi, SiScan および 3Seq のうち 3 以上のアルゴリズムで支持されるという条件で解析した。“Reference sequence selection” で “Internal and External Reference” とし

た以外は、デフォルト値をパラメーターとして用いた。

HAdV\_Chiba\_E086/2012 の型別のため penton base, hexon and fiber 遺伝子の塩基相同性を既知の HAdV-D の型と比較した。系統樹解析を MEGA5.1 (www.megasoftware.net) の Tamura Nei モデルにより進化距離を計算して近隣結合法により作成した。

## C. 研究結果

### 1. 分離株

得られた分離株が単一であることは、既報の手法 (Yamane et al., JV, 2013) により確認した。本分離株は、A549 での増殖性が良くウイルス分離は比較的容易と考えられた。アセンブルされたコンティグ配列は phred-q value  $\geq 20$  であることが確認されたことも単一株であることを支持していた。

### 2. ゲノム

HAdV\_Chiba\_E086/2012 のゲノム (AB765926) の塩基長は 35,198 bp であり、塩基組成は A (22.5%), T (20.3%), G (28.6%) and C (28.6%) であった。

### 3. 系統樹解析

penton base, hexon and fiber 遺伝子はそれぞれ HAdV-65, HAdV-48 および HAdV-60 とそれぞれ 98%, 99% および 95% の相同性を持っていた。このことから HAdV\_Chiba\_E086/2012 は P65H48F60 と要約できる組換え株と考えられた。

### 4. 組換え解析

入手可能であった 45 種類の HAdV-D の塩基配列とともに組換え解析をしたところ、

HAdV-48, 65, 29, 22 および 60 およびそれらの近縁と 3 種類の未知または祖先の HAdV-D の組換えが確認された。

## D. 考察

日本において、組換え型の HAdV-D が EKC の流行を引き起こしている。HAdV のうち D 種は重症の EKC を引き起こすことで知られている。HAdV-48 はこれまで日本において検出されたことがなく、本研究は日本における HAdV-48 関連ウイルスの最初の報告である。HAdV-48 は最初にエイズ患者から検出されたウイルスであるが、健康人も感染していることが過去の研究で確認されている。

HAdV\_Chiba\_E086/2012 は P65H48F60 と定義できるものと考えられた。系統解析および組換え解析の結果から、このウイルスは 59, 65, 48, 60, 22 型およびその近縁と思われる型のネステッド組換えにより生じたものと考えられる。

このような株は、HAdV-53, 54 および 56 が EKC の流行を引き起こしているのと同様に今後にも流行する可能性がある。また、その全塩基配列からユニークな株であり、新しい genotype とされるべきものと考えられる。

## E. 結論

HAdV\_Chiba\_E086/2012 は、日本における初の 48 型関連ウイルスであり、これまで報告された HAdV の中で最も複雑な進化の歴史を持っていると考えられた。EKC の病原体として流行する可能性を持つので、今後も継続的な監視が必要である。レファレンス活動をさらに強化している。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T. Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(3):260-1.
2. Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A case of atypical hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6: differential diagnosis from varicella in a pediatric intensive care unit. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(6):564-6.
3. Miyata I, Hanaoka N, Okabe N, Fujimoto T, Sakamoto S, Kasahara M, Saitoh A. Echovirus 3 as another enterovirus causing life-threatening neonatal fulminant hepatitis. *J Clin Virol.* 2013 Dec 7. pii: S1386-6532(13)00511-8.
4. Fujimoto T, Yamane S, Ogawa T, Hanaoka N, Ogura A, Hotta C, Niwa T, Yakou C, Gonzalez G, Aoki K, Koyanagi KO, Watanabe H: A novel complex recombinant form of human adenovirus species D, the first type 48-associated isolate in Japan, JJID, in press.

5. 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 日本臨牀別冊. 2013; No24. 373~376.

### 学会発表

#### 国際学会

1. Fujimoto T, Enomoto M, Kanou K, Hanaoka N, Adhikary AK, Yoshida S, Kobayashi M. Hand Foot and Mouth Disease in Japan, 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases. August 24-25, 2013, Tokyo, Japan.
2. Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T. Updated restriction endonuclease analysis based genome typing method of HAdV: application in pediatric infectious diseases caused by HAdV, 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases. August 24-25, 2013, Tokyo, Japan.
3. Oishi K, Ohkusa Y, Fujimoto T. Surveillance of hand foot and mouth disease in Japan, 1st ASEAN Hand Foot and Mouth Disease Workshop. April 11-12, 2013, Singapore.

#### 国内学会

1. 藤本嗣人, 小川知子, 花岡希, 小倉惇, 堀田千恵美, 仁和岳史, Gabriel G, 渡邊日出海. 結膜炎患者の眼から分離されたアデノウイルスD種48, 60および65型(候補株)のリコンビナント型の新しいアデノウイルス. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
2. 加納和彦, 牧野友彦, 藤本嗣人. コクサッキーウイルスA6ウイルスの病像変化に関する研究. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
3. 榎本美貴, 押部智宏, 近平雅嗣, 藤本嗣人, 林祥剛. 兵庫県における無菌性髄膜炎患者からのエンテロウイルス検出状況. 第61回ウイルス学会学術集会. 11月10 - 11日, 2013年, 神戸市.
4. 藤本嗣人, 榎本美貴, 花岡希, 谷口清州.

アデノウイルス感染にともなう胃腸炎の  
発症頻度. 第54回日本臨床ウイルス学会,  
6月8 - 9日, 2013年, 倉敷市.

5. 菅原民枝, 藤本嗣人, 花岡希, 大日康史.  
流行初期段階のkokosakki-A群9型の検  
出・同定—保育所の発疹集団発生 of 事例.  
第54回日本臨床ウイルス学会, 6月8 - 9  
日, 2013年, 倉敷市.
6. 菅原民枝, 藤本嗣人, 大日康史, 安井良  
則, 大石和徳. 保育所の集団発生におけ  
るkokosakki-A群9型の検出・同定. 第  
54回日本臨床ウイルス学会, 6月8 - 9日,  
2013年, 倉敷市.
7. 山本佳, 金川修造, 藤本嗣人. kokosakki  
ウイルスによる無菌性髄膜炎を契機  
に発見された本邦初のエンテロウイルス  
99類似株検出例. 第44回日本小児感染症  
学会, 10月25 - 27日, 2013年, 札幌市.

#### 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



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大前比呂思	<i>Plasmodium</i> 属マラリアの検査	検査技術協会	ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫便覧	検査技術協会	東京	2014	324-327
大塚菜緒 蒲地一成	百日咳. 新興・再興感染症 up to date	大石和徳	化学療法の領域 2013 年増刊号	医薬ジャーナル	大阪	2013	71-79
蒲地一成	百日咳検査の使い方		SRL 宝函 vol. 34, No. 3	エスアルエル	東京	2013	41-43

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
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 <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing	Jpn J Infect Dis.	66(1)	51-5.	2013
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 <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Jpn J Infect Dis.	66	216-221	2013
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
大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 宮崎義継.	<i>Cryptococcus gattii</i> 感染症 -新興・再興感染症 up to date-	化学療法の領域.	29 S-1	1144-1151,	2013
前川純子, 倉 文明, 大西 真, 渡辺ユウ, 渡辺祐子, 磯部順子, 田中忍, 中嶋 洋, 吉野修司	レジオネラ臨床分離株の型別 — レファレンスセンター活動報告として	病原微生物検出情報	34	161-162	2013

坂本裕美子、廣地敬、大西麻実、伊藤はるみ、高橋広夫、宮北佳恵、細海伸仁、片岡郁夫、久保亜希子、池田徹也、小川恵子、長瀬敏之、森本洋、清水俊一、伊豫田 淳、寺嶋 淳	白菜浅漬による腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例について - 札幌市	病原微生物検出情報	34	126	2013
太田昭生、高木積、大前比呂思、中野由美子、藤井充	発熱で受診した生殖母体を有する輸入熱帯熱マラリアの1例	臨床寄生虫学会誌	24	74-77	2013
鈴木真紀、黒崎貴子、加藤はる、佐藤隆也、古畑健司、山本明彦、宮上寛之	外部委託検査で創部から <i>Clostridium tetani</i> が分離された破傷風の1例	医学検査	62 (6)	698-702.	2013
駒瀬勝啓、染谷健二、竹田誠	日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009-2011	病原体検出情報	34	36-7	2013
染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠	2012年の海外の麻疹情報	病原体検出情報	34	24-5	2013
Miyaji M Otsuka N Toyoizumi-Ajisaka H Shibayama K Kamachi K	Genetic analysis of <i>Bordetella pertussis</i> isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan	PLOS ONE	8(10)	e77165	2013

