臨床分離株を用いた検討

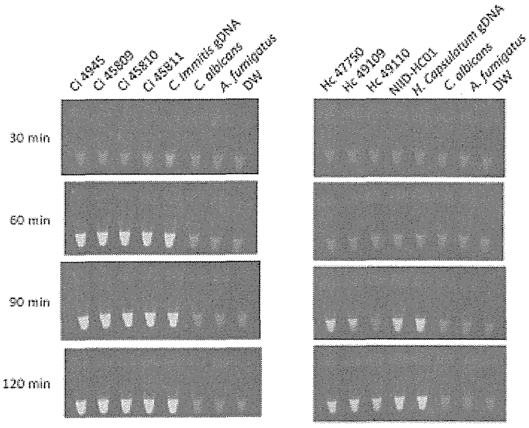

図 2.　複数の臨床分離株を用いた LAMP 法特異度の検討

これまで、*Coccidioides* 属、*Histoplasma* 属各 1 株ずつの臨床分離株から抽出し、精製したDNAを用いてLAMP法の検討を行ってきた。千葉大学真菌医学医療センターから両菌種複数株の臨床分離株を分与して頂き、それらの菌株を用いて LAMP 法の特異度を検討した（図 2)。また、検査をより簡便に行うことを目的に、DNA 抽出には精製キット等を使用せず、エタノール滅菌後の菌体を煮沸した上清を用いた。今回検討した各 4 株の臨床分離株は全て LAMP 法によって検出された。また、120 分の反応では陰性コントロールは検出されなかった。さらに、DNA を精製することなく菌体煮沸液を用いて検査を行うことができることがわかった。

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が予想できないので、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。

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、短時間で微量 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、今後検討を進めていきたい。

E. 結論

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キットを作製し、集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

1. Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. Journal of Clinical Microbiology. 52(7):2709-2712, 2014.
2. Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity

of fluconazole and their possible mechanisms of action. J Infect Chemother. 20(10):612-615, 2014.
3. Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H. A case of Fusarium paronychia successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream. J Dermatol. 41(4):340-2, 2014.
4. Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y. Exacerbation of Invasive *Candida albicans* Infection by Commensal Bacteria or a Glycolipid Through IFN-γ Produced in Part by iNKT Cells. J Infect Dis. , 2014.
5. Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka DNAkamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. IDCases. 1:5-8, 2014.

和文総説

1. 梅山　隆，宮﨑義継．侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断．．侵襲性カンジダ症．115-117, 2014年，医薬ジャーナル社．
2. 宮﨑義継，金子幸弘，樽本憲人．V. 感染症検査・真菌．パーフェクトガイド検査値事典[第２版]．477-481, 2014年，総合医学社．
3. 梅山　隆，大野秀明，宮﨑義継．真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで -Aspergillus：病態と抗原価の関連．感染症内科．2(6):575-580, 2014年．
4. 金子幸弘，浦井　誠，宮﨑義継．III 診断・治療法から見た大切な真菌症、4 治療薬の選択と投与．目で見る真菌と真菌症．p192-202, 2014年，医薬ジャーナル社，大阪．
5. 河野　茂，亀井克彦，二木芳人，宮﨑義継．座談会：深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く．呼吸．33(5):435-43, 2014年．
6. 大野秀明，宮﨑義継．日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ．日経サイエンス．44(5):76p76, 2014年，日本経済新聞出版社，東京．
7. 田辺公一，宮﨑義継．耐性病原体 up-to-date～耐性メカニズムから治療戦略まで～、I 抗微生物薬に対する耐性メカニズム、2 抗真菌薬耐性．化学療法の領域．30(S-1):20-5, 2014年．
8. 宮﨑義継，砂川富正，大石和徳．ミニ特集：病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から．小児科．55(4):403-6, 2014年．
9. 浦井　誠，金子幸弘，宮﨑義継．深在性真菌症における治療薬の選択の変化—ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望．どう変わり、どう攻める？深在性真菌症の新しい治療．感染と抗菌薬．1:5-13, 2014年．
10. 浦井　誠，金子幸弘，宮﨑義継．どう変わり、どう攻める？深在性真菌症の新しい治療：深在性真菌症における治療薬の選択の変化 - ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療

展望. 感染と抗菌薬. 17(1):5-13, 2014年.

11. 梅山 隆, 大野秀明, 宮﨑義継. ムーコル症：診断の実際とピットフォール. 呼吸器内科. 25(1):32-7, 2014年.
12. 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 渋谷和俊, 前﨑繁文, 宮﨑義継. 全身性カンジダ感染増悪におけるiNKT細胞の関与. Med Mycol J. 55J:J115-J122, 2014年.
13. 大野秀明, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 金子幸弘, 宮﨑義継. 接合菌症. 臨床検査. 58(1):97-103, 2014年.

2. 学会発表

1. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公徳, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 澁谷和俊, 宮﨑義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
2. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 大野秀明, 宮﨑義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
3. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 澁谷和利, 宮﨑義継. マクロファージの貪食を指標としたCryptococcus gattii感染病態の評価. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
4. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮﨑義継. 高病原性 Cryptococcus gattii の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
5. 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮﨑義継. 高病原性 Cryptococcus gattii の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
6. 田辺公一, 宮﨑義継. カンジダ症における薬剤耐性. 第97回日本細菌学会関東支部総会. 10月30-31日, 2014年, 東京.
7. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮﨑義継. 高病原性 Cryptococcus gattii の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
8. 名木 稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山隆, 山越 智, 大野秀明, 宮﨑義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
9. 本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮﨑義継, 早田 宏, 田代隆良, 河野茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であったPseudallescheria boydiiによる肺菌球症の1例. 第62回日本化学療法学会西日本支部総会・第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会・

第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同開催. 10 月 23 日-25 日, 2014 年, 岡山.

10. 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口 豊, 浦井 誠, 梅山 隆, 宮﨑義継. 黒色菌糸症の 1 例. 第 263 回日本皮膚科学会岡山地方会. 9 月 21 日, 2014 年, 岡山.
11. 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公徳, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮﨑義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第25回日本生体防御学会学術総会. 7 月 9-11 日, 2014 年, 仙台.
12. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 宮﨑義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
13. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木光二, 皿谷 健, 宮﨑義継. ミカファンギン耐性 Candida glabrata 株の in vitro 性状解析. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
14. 浦井 誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷哲芳, 政本大二郎, 水谷 真, 名木 稔, 上野圭吾, 山越 智, 田辺公一, 梅山 隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明, 宮﨑義継. 腹膜透析中に発症した Cryptococcus laurentii による腹膜炎の一例. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
15. 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山 隆, 川上和義, 大石和徳, 宮﨑義継. マウスモデルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンの感染防御効果の解析. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
16. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 名木稔, 宮﨑義継. 症例から学ぶ感染症セミナームーコル症の真菌同定検査. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
17. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮﨑義継. 病原糸状菌 Aspergillus fumigatus の Polo-like キナーゼ遺伝子破壊株の菌糸成長・分生子形成・抗真菌薬感受性への影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
18. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 亀井克彦, 宮﨑義継. カンジダ属の抗真菌薬感受性の変貌. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.
19. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮﨑義継. 高病原性 Cryptococcus gattii 由来莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.
20. 宮﨑義継. 真菌感染症について：薬剤耐性真菌. 第 3 回日本微生物学連盟市民公開フォーラム＜薬が効かない感染症の話-薬剤耐性感染症の現状とその対策＞. 4 月 26 日, 2014 年.

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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

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
　　　　　　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
　　　　　　見理　剛　　国立感染症研究所 細菌第二部

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。その危険性に対し的確な対処法を立案・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的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。

炭疽菌（*Bacillus anthracis*）は炭疽症の原因となる細菌で、第二次世界大戦以降、生物兵器として各国の軍事機関に研究され、1993 年のオウム真理教によるテロ未遂や 2001 年のアメリカのテロ事件にも利用された事がある。そのため、炭疽症のアウトブレイクが起きた際に、原因菌の出自を詳細に調査することはバイオセキュリティ上の重要な意味を持つ。出自を調査するにはコアゲノムを用いた分子系統解析を行うのが有効であると考えられるが、コアゲノム情報を用いた分子系統解析を容易に行えるツールは存在していなかった。そのため我々は *B. anthracis* の次世代シーケンス（next-generation sequencing: NGS）データをアップロードすると single nucleotide polymorphisms（SNPs）を抽出し、*B. anthracis* を含む *B. cereus* グループ中の系統的位置関係を推定するウェブアプリケーション GcoGSA-BA（Global core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*）を開発した。GcoGSA-BA はコアゲノム系統解析だけでなく、pXO1、pXO2 といった病原性を規定するプラスミドや pXO1 上に存在する三つの炭疽菌毒素遺伝子（lethal factor, LF; edema factor, EF; protective antigen, PA）を検出する機能も有しており、炭疽菌（*B. anthracis* Ames Ancestor）ばかりでなく炭疽菌毒素遺伝子を例外的に保持している *B. cereus* G9241 の系統的位置関係も正しく推定し、更に炭疽菌毒素遺伝子を検出することができた。テロを疑われる炭疽症のアウトブレイクが起きた際に GcoGSA-BA を用いることで、バイオテロリズムのために用意された株なのか、環境由来の病原菌なのかを迅速かつ容易に判断することができ、国内外のバイオセキュリティに大きく貢献することができると考えられる。順次、他カテゴリーA 病原体であるペスト菌、野兎病菌、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。

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ーンサーにより、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

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。詳細は研究結果を参照。

（倫理面への配慮）

該当なし

C．研究結果

<u>1）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</u>

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シークエ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。

炭疽菌が候補として浮上した場合、コアゲノム SNPs を利用した炭疽菌・菌株の類縁関係を推定するためのゲノムワイド SNPs 解析システム <u>G</u>lobal <u>co</u>re <u>g</u>enome <u>S</u>NP <u>a</u>nalysis for *<u>B</u>acillus <u>a</u>nthracis* (GcoGSA-BA) を開発した（図１と２）。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレル 657,183 箇所を用いたゲノム分子系統樹を作成できる（図３）。従来の MLST 法では分解能が非常に悪く、由来特定に難渋した菌株においても高精度に分類することを可能にした。

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（図２）。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毒素因子の特定も可能にした（図２）。

<u>２）国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析</u>

国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析を行った（感染研・細菌第二部・見理先生との共同研究）。公開ゲノム配列とのコアゲノム比較解析から、144,896 箇所の SNPs サイトを抽出し、ゲノム分子系統樹を作成した（図５）。従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し、茨城県と岩手県の分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた。

D/E. 考　察・結　論

これまで分担研究として、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データベース化を進めてきた。ゲノム情報を活用することにより有効なトレーサビリティーに役立てる目的である。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。本年度の課題として、情報解析の NGS – MePIC – MEGAN – GcoGSA の解読・解析パイプラインの運用と公開を目指した。検査現場からのデータ転送等、迅速にゲノム比較解析を行うために未だ解消されていないボトルネックが残っているが、誰もが簡便に利用できるシステムが先行していけば、シークエ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

- Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Komiya T, Hatakeyama T, Nakajima H, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Genetic characterization and comparison of *Clostridium botulinum* isolates from botulism cases in Japan between 2006 and 2011. Appl Environ Microbiol. 2014 Nov;80(22):6954-64. doi: 10.1128/AEM.02134-14. Epub 2014 Sep 5. PubMed PMID: 25192986; PubMed Central PMCID: PMC4249013.
- Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. Biosecur Bioterror. Volume 13, Number 1, 2015. DOI: 10.1089/hs.2014.0076 in press.

2） 学会発表

- 山下明史、関塚剛、黒田誠. GcoGSA-BA NGSデータから炭疽菌のコアゲノム系統解析を行うウェブアプリケーション。 第８８回日本細菌学会総会 岐阜市 平成 27 年 3 月 26-28 日（ポスター発表）
- Kenri T, Sekizuka T, Yamamoto A, Iwaki M, Takahashi M, Kuroda M, Shibayama K. Whole genome single-nucleotide polymorphism (SNP) Analysis of Clostridium botulinum isolates from botulism cases in Japan. 51th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC 2014), Philaderphia PA, USA. October 26-29, 2014. (Poster presentation).

H．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

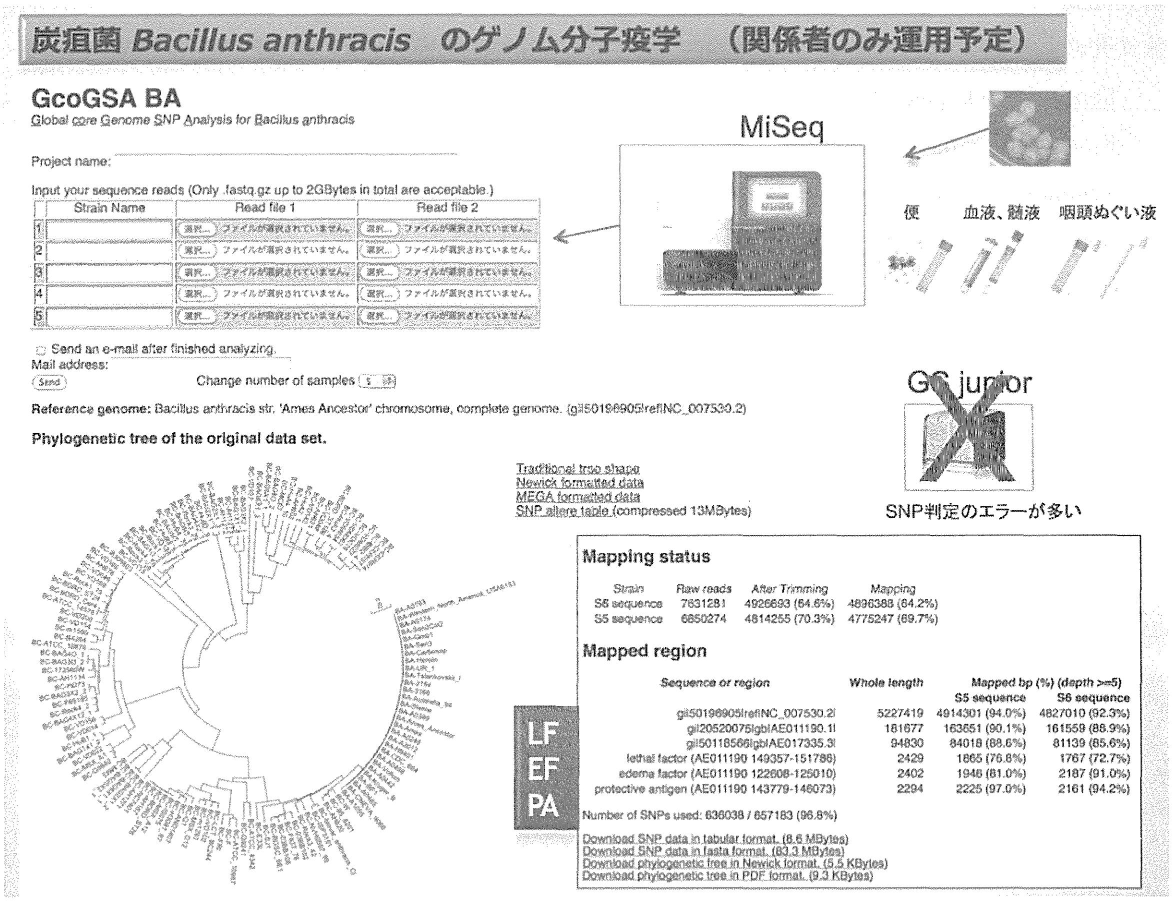

図１ MePIC - MEGAN による病原体検索の結果、炭疽菌が候補として浮上した場合、先に使用した解読リードを用いたゲノムワイド SNPs 解析システム Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA) を開発した。現在、関係者のみ運用可能としている。公開されている炭疽菌ゲノムと比較したゲノムワイド系統樹の生データまで作成し、適当な系統樹ビューワーで閲覧可能なデータをダウンロード可能である。炭疽菌は Bacillus cereus group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起こさぬよう、Lethal factor (LF), Edema factor (EF), Protective antigen (PA)の炭疽菌の病原因子の特定も可能にした。

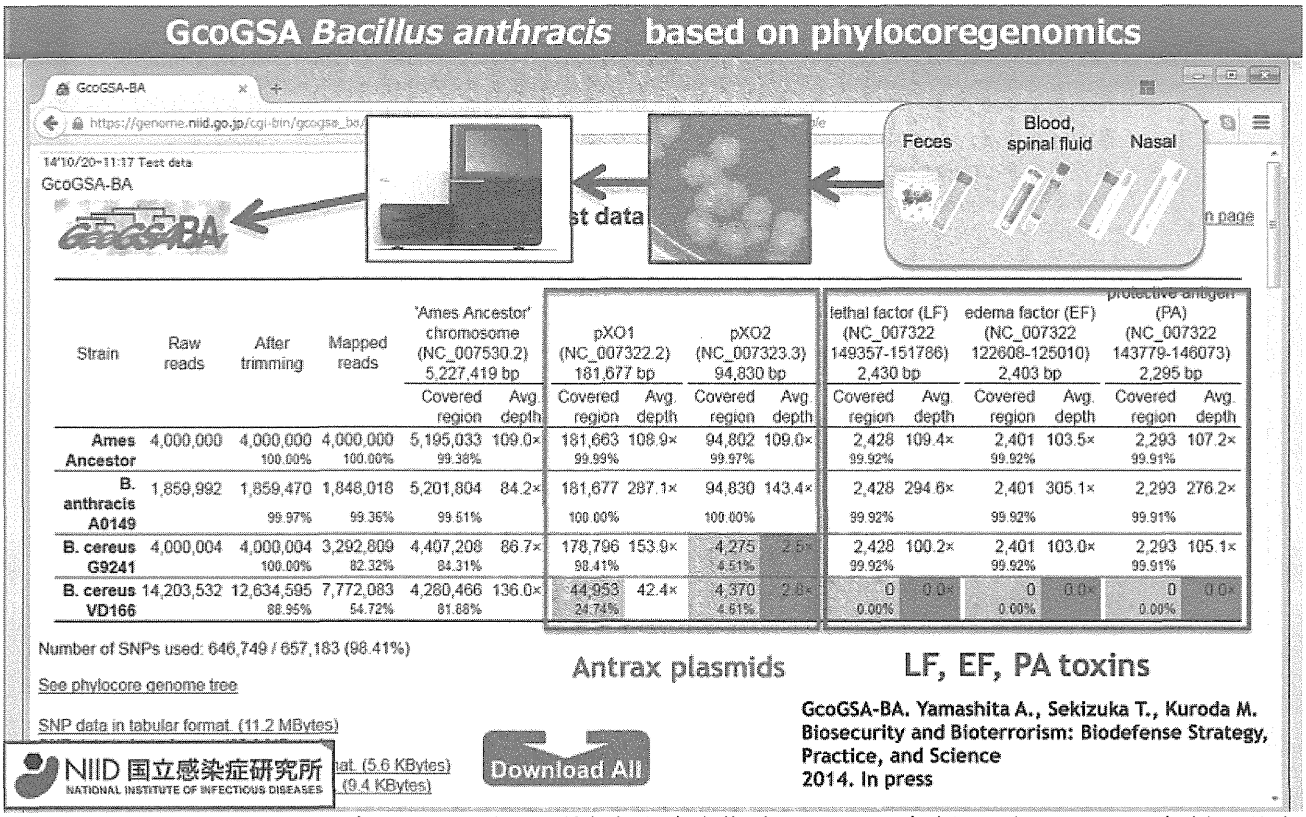

図２　GcoGSA を用いたコアゲノム SNPs 分子系統解析と炭疽菌プラスミド・毒素因子(LF, EF, PA 毒素)の特定

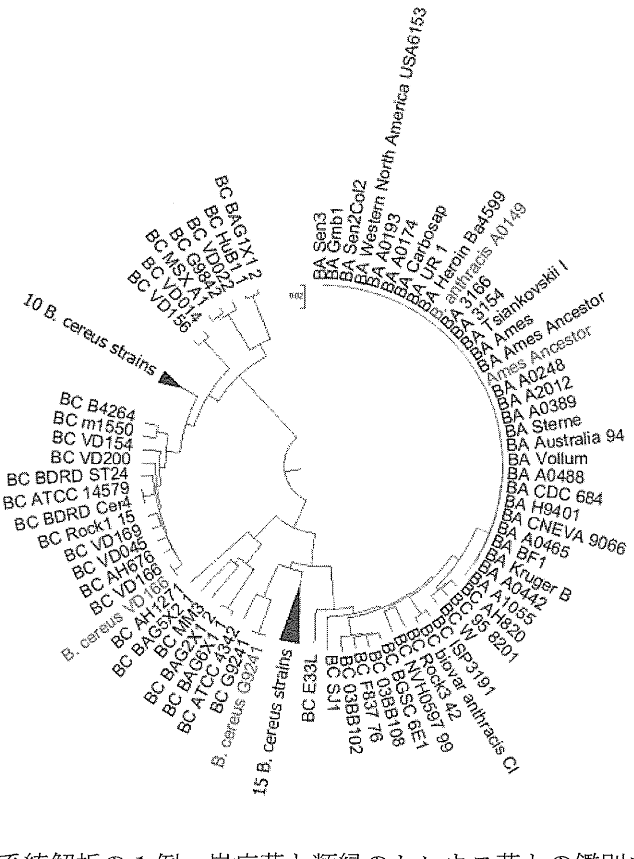

図３　コアゲノム SNPs 分子系統解析の１例。炭疽菌と類縁のセレウス菌との鑑別を容易にするだけでなく、炭疽菌株グループの中の詳細な分子疫学を可能とした。

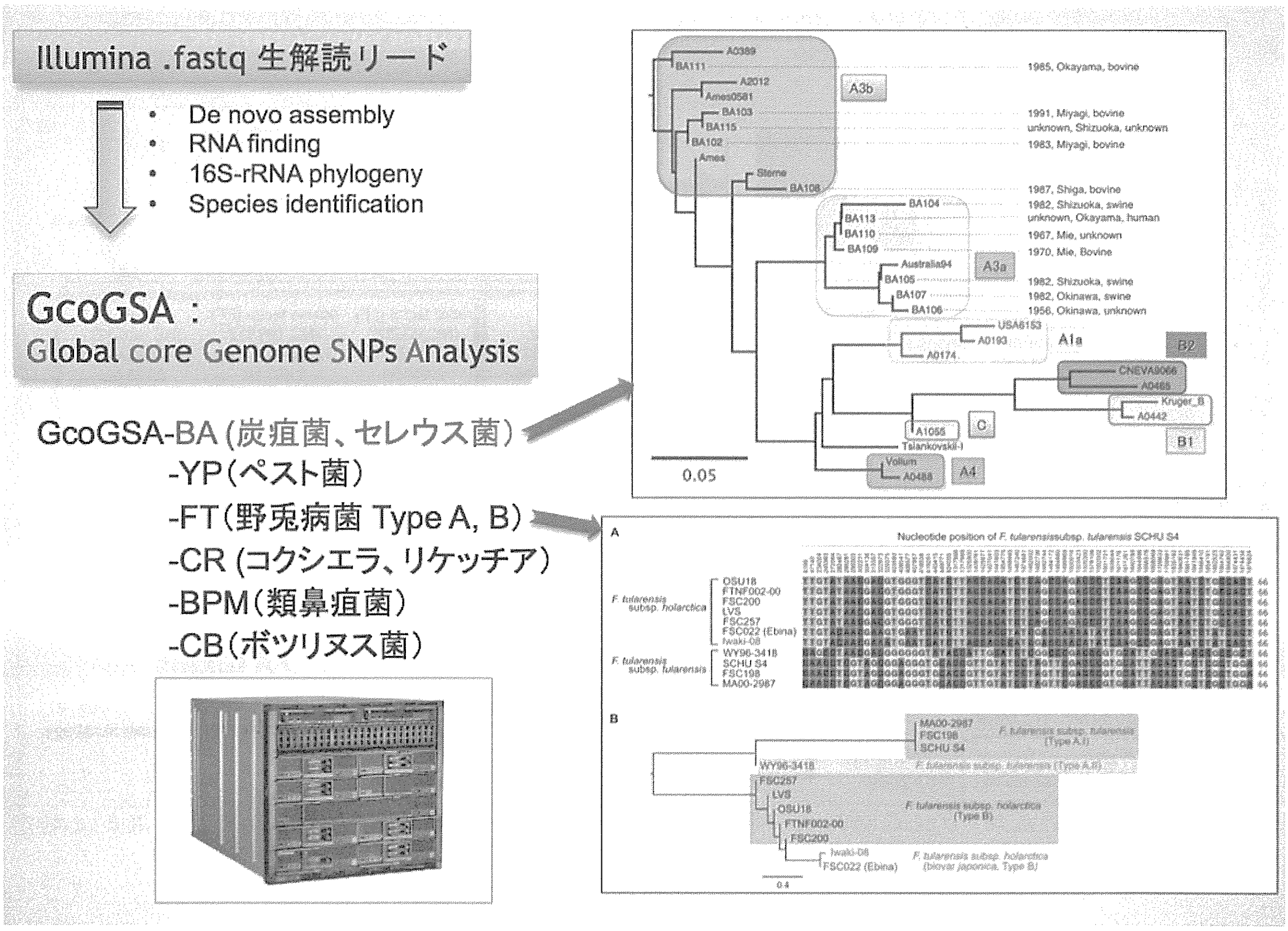

図４　今後、ペスト、野兎病、コクシエラ、類鼻疽、ボツリヌスと順々に構築予定である。

Appl Environ Microbiol. 2014 Sep 5. pii: AEM.02134-14. [Epub ahead of print]

Genetic characterization and comparison of Clostridium botulinum strains isolated from botulism cases in Japan between 2006 and 2011.

Kenri T[1], Sekizuka T[2], Yamamoto A[3], Iwaki M[3], Komiya T[3], Hatakeyama T[4], Nakajima H[5], Takahashi M[3], Kuroda M[2], Shibayama K[3].

Figure 5

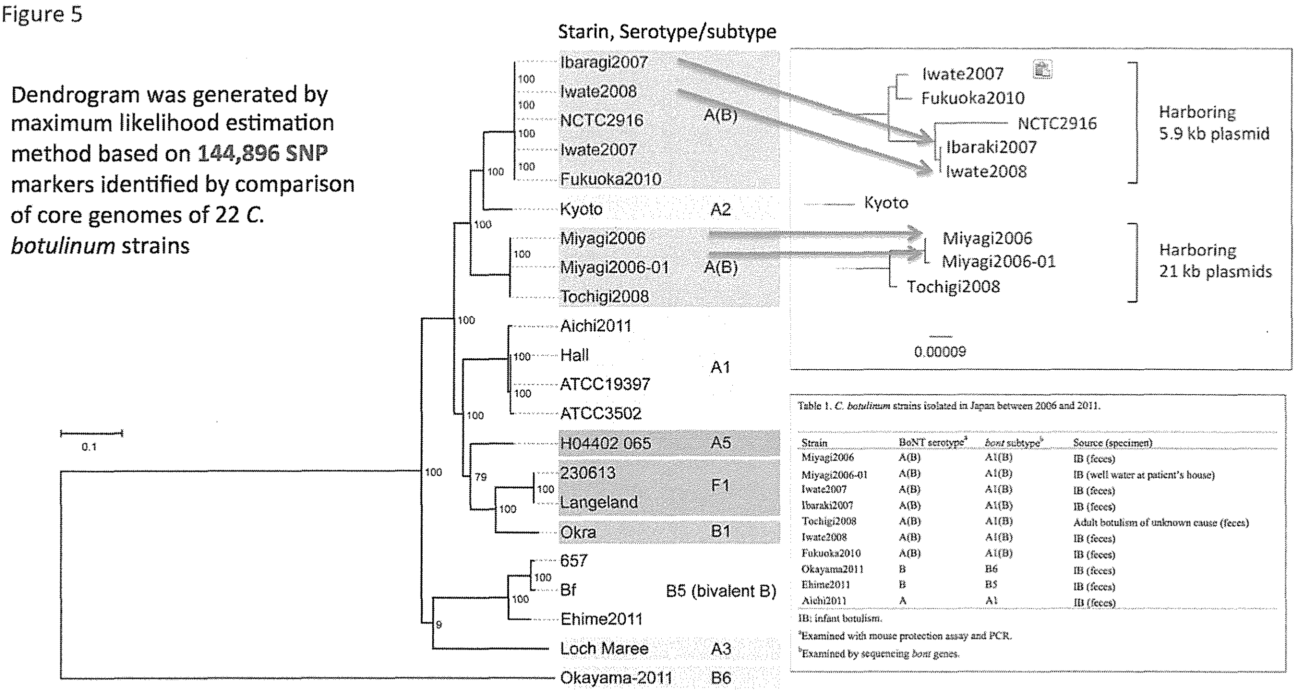

Table 1. *C. botulinum* strains isolated in Japan between 2006 and 2011.

Strain	BoNT serotype[a]	*bont* subtype[b]	Source (specimen)
Miyagi2006	A(B)	A1(B)	IB (feces)
Miyagi2006-01	A(B)	A1(B)	IB (well water at patient's house)
Iwate2007	A(B)	A1(B)	IB (feces)
Ibaraki2007	A(B)	A1(B)	IB (feces)
Tochigi2008	A(B)	A1(B)	Adult botulism of unknown cause (feces)
Iwate2008	A(B)	A1(B)	IB (feces)
Fukuoka2010	A(B)	A1(B)	IB (feces)
Okayama2011	B	B6	IB (feces)
Ehime2011	B	B5	IB (feces)
Aichi2011	A	A1	IB (feces)

IB: infant botulism.

[a]Examined with mouse protection assay and PCR.

[b]Examined by sequencing *bont* genes.

図５　国内分離ボツリヌス菌のゲノム分子疫学解析（感染研・細菌第二部　見理先生との共同研究)。国内分離株と公開ゲノム配列のコアゲノム比較解析から、144, 896 箇所の SNPs サイトを抽出し、ゲノム分子系統樹を作成した。従来の分子疫学解析を精度よく評価することに成功し、分離県と年代が異なる分離株においても由来特定と同一性を議論する基盤情報を収集解析することができた。

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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立

研究分担者　中島　典子（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨　バイオテロに使用された既知あるいは未知の病原体を病理組織中に検出する方法として、病原体のゲノムをオリゴヌクレオチドプローブを用いた in situhybridization 法がある。今年度は我々が開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing（ISH-AT）法と市販されているZ型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐DNA-ISH法であるViewRNA法とRNAscope法を比較検討した。標的核酸のコピー数が100/細胞の場合は両者とも検出可能であり、プローブ作製までの日数、とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT法を第1選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、プローブ数の多い、分岐DNA-ISH法も試行する予定である。分岐DNA-ISH法であるView RNA法とRNAscope法については今後さらに比較検討する予定である。

A．研究目的

バイオテロ対策として病原体の病理学的検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や*in situ*核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization（ISH）法がある。良質な抗体がすでにある場合、免疫組織化学は安定した検出系となるが、未知の病原体等の場合、あらたに特異的な抗体を作製しなければならず、時間を要し緊急対応は難しい。外来病原体遺伝子を次世代シークエンス法等により同定できるようになった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。従来、オリゴヌクレオチドプローブによる ISH 法は感度が低く実用的でなかったが、我々の開発した ISH-AT 法や市販のZ型オリゴヌクレオチドプローブ（ターゲットハイブリ）と分岐 DNA プローブを用いた ISH 法は高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる。分岐 DNA-ISH 法は現在2社から販売されている。QuantiGene View RNA（Affymetrix 社、ベリタス社）と RNAscope（ACD 社、コスモバイオ）であり、後者のほうが反応ステップが多いが、それだけ感度がいいと宣伝されている。また後者では、HRP-DAB の発色が

可能であり、より解像度の高い染色像が得られる。この方法で用いるプローブは標的遺伝子の塩基配列情報（最低300塩基長以上）を提供するだけで検出用の混合プローブを注文できる。実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え、最良の検出方法を確立するために、今回、ISH-AT法とViewRNA法、RNAscope法を比較検討した。

Ｂ．研究方法

1)材料

a)　病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を使用。ヒト剖検組織：パンデミックインフルエンザA/H1N1pdm09剖検肺組織、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）剖検リンパ節。動物実験剖検組織：　中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS CoV）感染マウス組織(国立感染症研究所・感染病理部岩田先生より分与)。

b) プローブ

・ISH-AT法用のプローブの作成：A/H1N1pdm 09（AB538390.1）：NP領域に2ヵ所。

SFTSV　：S鎖領域1ヶ所、L鎖領域1ヶ所に設計したプローブ。

MERS-CoV:：NP及びEnv領域に1種類ずつ作製した。ISH-AT施行時には、2種類のプローブのmixtureとした。

・分岐DNA-ISH法のプローブの注文(ベリタス社)：A(H1N1)pdm 09（AB538390.1）NP部分20ヵ所の混合プローブと 2 ヵ所のの混合プローブ、SFTSV S 鎖 領域に 20 か所(ベリタス社)あるいは 19 ヵ所の混合プローブ(コスモバイオ社)を作成した。

2)　方法

・ISH-AT法

前処理法：抗原賦活液(DAKO社)中で95℃、40分、膜透過処理を行い、Proteinase K(PK)(DAKO社）濃度を0.1, 1, 5, 10, 100μg/mlにして至適濃度を決定した。またRNAscope法のキットの Pretreatment2 液で煮沸 15 分、Pretratment3 液40℃処理を15あるいは30分行った。

発色法：アルカリフォスファターゼーFast rsdの系と、HRP-DABの系の両方を試行した。後者では検出感度を上げる際はチラミドで増幅するCSA法を併用した。

・分岐プローブISH法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが、ホルマリン再固定のステップは省略した。

（倫理面への配慮）検討材料は剖検組織であり、剖検時に使用の承諾が得られている。感染動物標本に関しては動物実験委員会の承認を得て実験が行われた。

Ｃ．研究結果

（１）　ISH-AT法の前処理

前処理の条件はサンプルによって至適化しないといけないが、これまでPKはまず0.1μg/ml で試行し、検出できない場合は 1μg/ml にしてきた。A/H1N1pdm09 肺炎の剖検肺組織(100 コピー/細胞)を用いて前処理で結果がどのように変わるか確認したところ、PK=1 がもっとも検出率がよく、10,50,100μg/mlにすると抗原シグナルが増えても組織の形態が損傷されて（過消化）いた。RNAscope の試薬を用いた前処理ではヒト肺組織で推奨されているstrong という条件で PK1μg/ml と同等の結果が得られた。

（２）　ISH-AT法によるMERS CoV感染マウス組織におけるウイルスRNAの検出

免疫組織化学で示されたウイルス抗原の局在に一致してウイルスゲノムが検出された。

ウイルスコピー数が 10^5 コピーと 10^3 コピーの検体で試行したが、コピー数が多い切片でより多くの陽性シグナルが検出された。10^3 コピーの検体でも陽性シグナルが得られた。

（3） ISH-AT法と分岐DNA-ISHに用いるプローブの比較

双方とも標的核酸の40塩基に対し、1つあるいは1組のオリゴプローブがハイブリする。A/H1N1pdm09のNP領域2ヵ所にISH-AT用オリゴヌクレオチドプローブを作成し混合プローブとした。分岐DNA-ISH法用にはNP領域20ヵ所の混合プローブと2ヵ所の混合プローブを用意した。切片中のmRNAのコピー数が 10^4 コピー/細胞である切片において、2ヵ所の混合プローブを用いたISH-AT法では十分量検出できたが、2ヵ所の混合Z型プローブを用いた分岐プローブ－ISH法ではほとんど検出できなかった。よって2ヵ所のprobe（結合部分は計80塩基長）での検出感度はISH-AT法のほうが高感度といえる。RNAscopeの系では2ヵ所の混合Z型プローブで検出可能かどうか今後解析する予定である。RNAscope法では標的核酸について最低300塩基長を要するのでISH-AT法と同等の感度には5-7組のプローブmixtureを要することが予想される。逆にISH-AT法ではプローブ数を増やすことで検出感度を上げられる可能性が十分考えられた。

（4） SFTS剖検リンパ節におけるウイルスゲノムの検出

ISH-AT法とViewRNA法で比較すると、迅速・簡便性、感度はほぼ同等であった。

ISH-AT-CSA法とRNAscope法を比較するとコピー数の多い切片では両者の検出感度はほぼ同等であったが、コピー数が少なくなるとRNAscope法のほうがよりシグナル/ノイズ比が高く、陽性シグナルが多かった。

D．考察

次世代シークエンス法などにより患者あるいは死亡者から採取した検体中の病原体遺伝子を同定され、塩基配列の一部でも確定できれば、速やかにISH用のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、病理切片中で病原体遺伝子検出し、その体内分布（局在）を明らかにできる。検出方法としてはコピー数がある程度あればISH-AT法が最もはやく対処できる。死亡時にはすでに組織中に残存するウイルスコピー数が少ない場合はリアルタイムRT-PCRで切片中に残存する標的遺伝子の量を測定し、1000コピー以上であればISH-AT法で検出できる可能性があると判断している。コピー数が少ない場合、市販の分岐DNA-ISH法も試行してみるべきである。現在国内ではベリタス社（QuantiGene View RNA）とコスモバイオ（RNAscope　ACD社）が販売している。難点は非常にコストがかかることである。1スライドの反応にプローブと試薬代が1~2万円かかる。RNAscope法のほうが感度がよいと思われるが、リアルタイムRT-PCRにより解析したコピー数とつき合わせてより詳細な検出感度を検討する必要がある。また非特異シグナルなども併せて検討する予定である。

E．結論

病原体遺伝子のin situ検出法を比較検AT法、ISH-AViewRNA法、RNAscope法では、標的核酸のコピー数が100/細胞の場合はほぼ同様の検出感度であった。プローブ作製までの日数、

とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT法を第1選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、ISH-AT法の前処理やプローブ数を増やすなどの工夫をしながら、プローブ数の多い、分岐DNA-ISH法も試行する予定である。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology. Sep 28. 2014 [Epub ahead of print]

2. Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. Int J Hematol. 100(1):70-8, 2014

3. Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. Cell Host Microbe. 15(6):692-705, 2014

4. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. J Virol. 88(10):5608-16, 2014

5. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and

retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. 209(6):816-27, 2014

6. 中島典子：H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見. 化学療法の領域 30:40-48, 2014

7. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹：ウイルス性肺炎. 病理と臨床 32：1146-1153, 2014

8. 中島典子：オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション法. 呼吸 33: 152-159, 2014

9. 高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅 実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・脳症の病理 Neuroinfection. 神経感染症 19:32-39, 2014

10. 中島典子：インフルエンザ感染症の病理. 小児内科 2014, 45:1935-1941

2. 学会発表

1) 国際発表

1. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease TMPRSS2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014)- XIVth International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology（カナダ）2014

2. Osamu Kotani、Naeem Asif、Tadaki Suzuki、Naoko Iwata、Noriko Nakajima、Harutaka Katano 、 Takushi Hosomi 、 Hiroyuki Tsukagoshi、Hideki Hasegawa、Fumihiro Taguchi、Hiroyuki Shimizu、Noriyo Nagata Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. International Picornavirus meeting (Europic2014)（ベルギー）2014

3. Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen Trung Thuy , Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program（東京）2014

2) 国内発表

1. 酒井宏治、網康 至、田原舞乃、久保田耐安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田 誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代眞人、竹田 誠：II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつA型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である. 第 62 回日本ウイルス学

会学術集会（横浜）2014年11月

2. 渡辺登喜子、Gongxun Zhong Colin Russell、中島典子、八田正人、Anthony Handson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕：スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル. 第62回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014年11月

3. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古屋哲也、水谷哲也、今岡浩一、森川 茂：日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス（feline morbillivirus, FMV）の疫学調査. 第62回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014年11月

4. 福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰 宗太郎、保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀樹、黒田 誠、片野晴隆：網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCRの改良と臨床検体への応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014年11月

5. 竹田 誠、中島典子、河岡義裕：TMPRSS2は、インフルエンザの病原性発現に必須の宿主プロテアーゼである. 第88回日本感染症学会学術講演会（福岡）2014

6. 竹田 誠、中島典子、水田克巳：宿主プロテアーゼTMPRSS2は、急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である. 第55回日本臨床ウイルス学会（札幌）2014

7. 仲里 巌、喜舎場由香、新垣和也、加藤誠也、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：新生児心筋炎の3剖検例. 第103回日本病理学会総会（広島）2014

8. 秋田英貴、鄭子文、中島典子、星本和種、笹島ゆう子、瀧本雅文：風疹感染胎盤の一例. 第103回日本病理学会総会（広島）2014

9. 中島典子、渡辺登喜子、佐藤由子、高橋健太、鈴木忠樹、田代眞人、河岡義裕、長谷川秀樹：ヒトから分離されたH7N9亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析. 第103回日本病理学会総会（広島）2014

10. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋 徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、森川 茂、西條政幸、倉田 毅：日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の病理解析. 第103回日本病理学会総会（広島）2014

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
   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
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

病原体の電子顕微鏡学的迅速検出法の確立

永田　典代　国立感染症研究所　感染病理部　第二室長

研究要旨：バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心として電子顕微鏡を用いた病原体の迅速検出法の確立を目的とする。今年度は、ウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を対象として、血中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

研究協力者：
国立感染症研究所　感染病理部
鈴木忠樹、岩田奈織子、佐藤由子、片岡紀代、小谷 治、原嶋綾子、長谷川秀樹
国立感染症研究所　ウイルス第一部
福士秀悦、高崎智彦、吉川智城、西條政幸

A. 研究目的

透過型電子顕微鏡による病原体の検出方法は迅速性、簡便性に優れ、スクリーニングによる包括的な鑑別診断が可能という点でバイオテロ対策や新興・再興感染症のウイルス学的診断の一助となる。本研究では、バイオテロに使用される可能性のある病原体等を中心とした電子顕微鏡を用いた迅速検出法の確立を目的として、1．BSL3, BSL2 病原体に十分対応するための電子顕微鏡学的検査法の標準手順の見直し、2．ウイルス・細菌の迅速検出法に必要なレファレンス標本の作製、見直しと改善、3．検出の感度・精度を向上するための改良法の 3 点を課題としている。

2014 年は、デング出血熱の日本国内発生や西アフリカにおけるエボラウイルスのアウトブレイクによる輸入感染疑い例の発生が問題となった。いずれも高いウイルス血症が特徴的であり、患者血清を用いたウイルス粒子の検出が可能な感染症である。そこで、今年度は、血液検体からのウイルス粒子の検出法の標準手順書の見直しを行った。

B. 研究方法

高いウイルス血症を引き起こすウイルス感染症を文献的にリストし、各ウイルス粒子電子顕微鏡像のリファレンス標本を整理した。また、不活化法を文献的に調査し、標準手順を見直した。対象とするウイルス粒子の標本は、これまでにわれわれが当該研究で準備し、撮影したもの（表中に NIID と表記）、Koch 研究所による外部評価の際にわれわれが撮影したもの(同、EQA)、および、2010 年 12 月 1-2 日に Koch 研究所主催された GHSAG wet-lab workshop on diagnostic electron microscopy of pathogens でわれわれが撮影した画像(同、GHSAG)を含む。

C. 結果

高ウイルス血症を引き起こす可能性のある主なウイルスの粒子の特徴と電子顕微鏡像を表にまとめた。他に A 型肝炎ウイルス（*Picornaviridae, Hepatovirus*）、パルボウイルス B19（*Parvoviridae, Erythrovirus*）が主なウイルスとして挙げられる。また、血液中のウイ

ルス粒子の迅速検出法の標準手順を図にまとめた。不活化処理は、文献的に調査し、Koch 研究所および CDC の標準手順を考慮した結果、2%-4% グルタールアルデヒドもしくは 2%パラフォルムアルデヒド液で 30 分〜2 時間室温固定(200 µl で十分)し、紫外線照射との組み合わせで行うこととした。

D. 考察

実際に高ウイルス血症発症時のデング熱患者の血清を用いて電子顕微鏡学的にウイルス粒子の検出を試みると、直接法の場合は、染色液は酢酸ウラン液を用いるよりもリンタングステン酸を用いた方が、染色液の浸透が効率よく、血清原液でも粒子を検出することが可能であった（データは示さない）。しかしながら、血清由来タンパクなどの夾雑物が多いため、10 倍以上のリン酸緩衝液による希釈を行った方が、検出効率が良かった。よって、実際に患者血清を検索する場合は、血清原液をある程度、段階希釈し、リンタングステン酸染色を選択した方がよいであろう。しかしながら、電子顕微鏡学的観察には、少なくとも 10^6/ml 以上のウイルス粒子が存在しないと検出が困難となり、病期によっては、ウイルス量が低く、超遠心等を利用したウイルス粒子の濃縮が必要となる。また、病原体によっては、白血球への感染が優勢との報告があるため（エボラウイルス、オルソポックスウイルス、細胞内寄生性細菌など）、白血球を回収し、これを迅速包埋し検索に用いた方が効率がよい可能性もある。また、2014 年の西アフリカにおけるエボラウイルスの大流行をうけ、今後は、BSL4 病原体にも十分対応ができるように標準手順書を見直す必要がある。

E. 結論

血液中のウイルス粒子の電子顕微鏡学的検出法について検討し、手順を整理した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1） Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology. 2014. doi: 10.1111/neup.12171.

2）Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. J Virol. 2014. 88:8597-8614

3）Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J. Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice. J Virol. 2014. 88:7178-7188

2. 学会発表

1） 岩田 奈織子、福士 秀悦、福間 藍子、鈴木 忠樹、竹田 誠、田代 眞人、長谷川 秀樹、永田 典代.中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について。第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし