

福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健. フィリピンのコウモリからのブテロパインオルソレオウイルスの分離. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) .

- 7) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. ワクシニアウイルスLC16m8株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 8) 岩田奈織子、福士秀悦、福間藍子、鈴木忠樹、竹田誠、田代真人、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. 11).
- 9) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

H. 知的所有権の取得状況  
無し

図1) イシククル様ウイルスの各種培養細胞における増殖性

細胞	由来	ウイルス増殖
Vero	アフリカミドリザル腎	+++
Vero E6	アフリカミドリザル腎	+++
Huh7	ヒト肝細胞	+++
SW13	ヒト副腎皮質	+++
U2OS	ヒト骨肉腫	++
TB1-Lu	コウモリ肺	++
Jurkat	ヒトT細胞	+
Daudi	ヒトB細胞	—
C6/36	ヒトスジシマカ	+/-

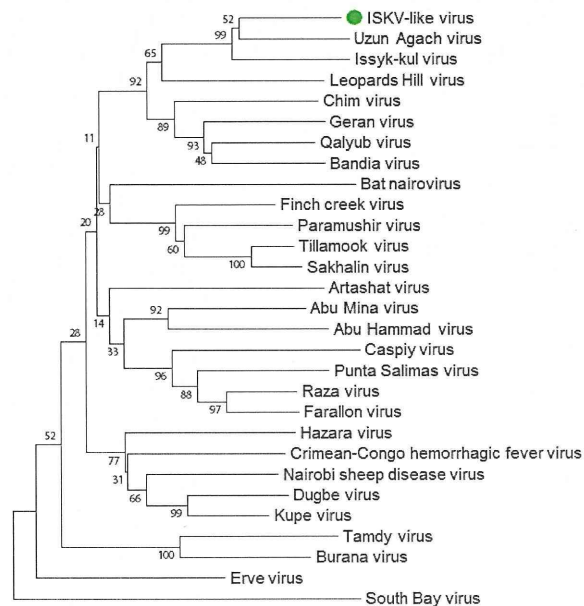


図2) イシククルウイルス(Issyk-kul virus)、イシククル様ウイルス (ISKV-like virus) および、近縁ウイルス(ブニヤウイルス科ナイロウイルス属)の分子系統樹(L遺伝子の部分配列より作製)

### 図3) Primer and Probe

<b>like-S probe</b>	<b>FAM-CGGAGAGATGCGTATGGATT-TAMRA</b>
like-S forward	CCAGTGTGCTCAACTGGAGA
like-S reverse	CCTCACCCATCCTACATGCT
<b>like-M probe</b>	<b>FAM-CACCCAGATGTACAGTGCTGA-TAMRA</b>
like-M forward	TGAACCAAAGACGAGCACAG
like-M reverse	CAGGACCCTTCAGACCATGT
<b>like-L probe</b>	<b>FAM-TGTGCTTAATGGCTGTGGAG-TAMRA</b>
like-L forward	CAGGACAAGATGCTGACGAA
like-L reverse	GACTTTGGGGTGTTTGTGCT

図4) One Step RT-PCRによるインククル様ウイルス遺伝子の検出

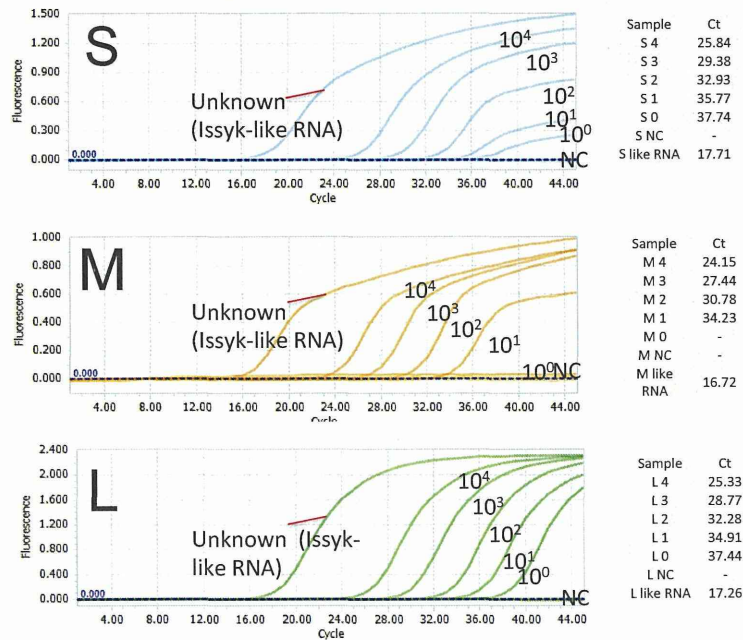
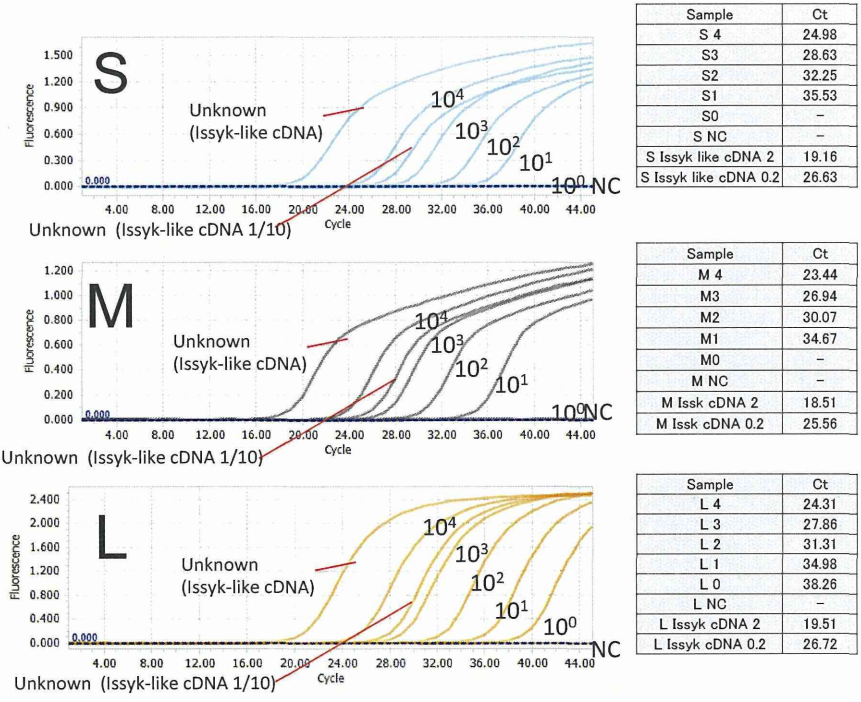


図5) Two Step PCRによるイシクク様ウイルス遺伝子の検出



## 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法

担当責任者： 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長

研究協力者： 木村昌伸、奥谷晶子、鈴木道雄、朴ウンシル 国立感染症研究所獣医科学部

吉河智城 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨: 21世紀に入り新種のブルセラ属菌の発見・報告が相次いでいる。そのような中、2012年には、無尾類より新たなブルセラ属菌が分離され、患者より分離された *B. inopinata* と近縁であることが報告された。我々は国内の愛玩用無尾類よりブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施し、イエアメガエル、デニスフロッグからそれぞれ1株、計2株の新規ブルセラ属菌を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較し、得られた遺伝子情報に基づき遺伝子診断法、鑑別法を開発することを目的としている。

まず、2株のカエル由来ブルセラ属菌（A105株、A141株）について、次世代シーケンサーMiseqを用いて各々の全ゲノム情報を得た。得られたContigについてGene annotationを行い、さらに、*B. melitensis*のゲノム配列を対照として遺伝子地図を作成した。次に、遺伝子タイピングに用いられる9座の遺伝子について全遺伝子配列を決定し、他のブルセラ属菌と比較し、ホモロジー解析と系統樹解析を実施した。その他、ブルセラ属菌で保存性の良い16S rRNA遺伝子および病原性遺伝子群である *virB* 遺伝子についても解析を行った。Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* は単一のクレードを作ることが明らかとなり、カエル分離株2株（A105、A141）は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と第2のクレードを構成していた。さらに、通常の9座遺伝子タイピングでは対応できていなかった、主として Novel species のブルセラ属菌間についても、その遺伝子的差異を明らかにした。

PCRを用いた特異的遺伝子検出法を開発するため、9座の全遺伝子配列について、Classic species等との一塩基変異部位を複数箇所特定し、センス、アンチセンスとも、その変異部位が3'末端にくるようなプライマーセットを設計した。設計した数種のプライマーセットのうち3セットが特異的増幅を示したが、中でも *glk* 遺伝子を標的としたプライマーセットは非常に特異性、増幅効率が良好であった。カエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法が開発された。

## A. 研究目的

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) は、世界中の多くの国と地域で未だ主要な人獣共通感染症であるブルセラ症 (brucellosis) の起炎菌である。そのなかで、ヒト患者も多く主要なものとしては、病原性の順に *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* の 4 菌種が知られている。

ブルセラ属菌は、19 世紀のクリミア戦争時代に英国軍兵士の間で流行したマルタ熱 (波状熱) の原因菌として、1887 年、Sir David Bruce により *B. melitensis* (自然宿主: ヤギ、ヒツジ) が最初に分離され、次いで、*B. suis* (ブタ、1914 年)、*B. abortus* (ウシ、水牛、1918 年)、*B. ovis* (ヒツジ、1953 年)、*B. neotomae* (げっし目、1957 年)、*B. canis* (イヌ、1968 年) が発見・報告されてきた。その後、新たな菌の報告はしばらく無かったが、1997 年に海棲哺乳類から *B. maris* (現在は、*B. ceti* (クジラ、イルカ) および *B. pinnipedialis* (アザラシ)) が報告されると、21 世紀に入り、*B. microti* (アカギツネ、common voles、土壌、2008 年)、*B. inopinata* (BO1 株、患者由来、2010 年)、*B. inopinata*-like (BO2 株、患者由来、2010 年)、その他、未分類ではあるが *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 (いずれもげっし目)、*B. sp.* NVSL 07-0026 (バブーン)、など新たな発見が続いている (表 1)。

そのような中、2012 年には、独、米の異なるグループにより無尾類 (カエル) に由来する新たなブルセラ属菌が相次いで分離された。遺伝子解析の結果、これらはブルセラ症患者から分離され、未だ自然宿主が不明である *B. inopinata* BO1 および BO2 に最も近縁とされた。我が国にも種々の外

国産無尾類が輸入されており、また、国内ブリーダーによる外来種の生産個体と合わせて、愛玩用として流通・販売されている。そこで、我々は外国産および在来種の無尾類より、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を試み、輸入外国産カエル 2 種から新規ブルセラ属菌 2 株 (A105、A141 株) を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較すること、また、得られた遺伝子情報をもとに、遺伝子診断・鑑別法を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 全ゲノムシーケンス:

国内 2 カ所の両生類飼育施設で、それぞれ飼育されていたイエアメガエル (*Litoria caerulea*) とデニスフロッグ (*Rhacophorus dennysi*) から分離された 2 株のブルセラ属菌 (A105 株、A141 株) を研究に用いた。

これら 2 株より、それぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサー Mizeq (illumina 社) で各々の全ゲノム配列情報を得た。Mizeq により得られた Contig について、微生物アノテーションツールである MiGAP (Microbial Genome Annotation Pipeline、<http://www.migap.org>) を用いて Gene annotation を行った。さらに、さらに、ブルセラ属の基準株である *B. melitensis* biover 1 strain 16M (NCBI accession number: CP007763, CP007762) のゲノム配列を対照として遺伝子地図 (塩基配列地図) を作成した。地図作成には、GView Server (<https://server.gview.ca>) を使用した。

## 2. 16S rRNA 遺伝子解析：

A105 株および A141 株のアノテーション後の配列情報から、16S rRNA 遺伝子全長 1492bp について、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列と NJ 法で系統樹解析を行った。アウトグループとしてブルセラ属に最も近縁の *Ochrobactrum* 属菌、2 種 (*O. anthropi*, *O. intermedium*) の相同配列を用いた。

## 3. 多座遺伝子解析 (MLSA)：

近年、ブルセラ属菌の遺伝子タイピング法として多座遺伝子解析法 (*Brucella* MLSA 9, Whatmore et al. 2007) が行われている。同法ではハウスキーピング遺伝子 9 座の、それぞれ、約 500bp の部分配列を連結して解析することで家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、海棲哺乳類由来ブルセラ菌の全株を 27 のシーケンスタイプ (ST) として識別することができる。しかし、近年になって発見された *B. inopinata* などには対応していないため、カエル由来株に対し MLSA 9 を用いた場合、いくつかの配列は、定法では増幅が困難であることが判明した。我々は、A105 株および A141 株について、MLSA9 で用いられる 9 座の遺伝子の全配列を決定し、16S rRNA 遺伝子と同様に、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列、9 座それぞれ単独、および 9 座連結 (concatenate 12,353bp) として NJ 法で系統樹解析を行った。

## 4. IV型分泌機構遺伝子解析：

細胞内寄生性をもつブルセラ属菌は、宿主細胞へ侵入後、IV型分泌機構 (T4SS) を介して、直接エフェクタータンパク質を輸

送することが知られている。このブルセラ属菌の主要な病原因子である T4SS の構成遺伝子である *virB* 遺伝子群 (*virB1*~*virB11*) は、ゲノム中に隣接して配列し、属内で高度に保存されている。*virB* 遺伝子群 (pathogenicity island, 12,353bp) について、A105 株および A141 株と他のブルセラ属菌の相同配列を NJ 法により解析した。

## 5. 遺伝子診断法の開発：

ブルセラ属菌の遺伝子検出には、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcs31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられている。これは、全てのブルセラ属菌に保存されている。我々は、通常、*bcs31* (1 組) に *omp31* (1 組) および *omp2* 遺伝子領域 (2 組) を標的としたプライマー計 4 組を組み合わせることで、ヒトに感染する主要 4 菌種を特定している。ただ、A105 株および A141 株は、*B. suis* と同様の反応性を示し、区別ができない。そこで、全配列が明らかとなったハウスキーピング遺伝子 9 座について、他のブルセラ属菌と比較を行い、一塩基変異部位を複数箇所特定した。その部位について GC 含量や Tm 値を検討しながら、センス、アンチセンスとも、その変異部位が 3'末端にくるようにプライマーセットを設計した。PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、GeneAmp PCRSystem9700 (Applied Biosystems) で実施した。

## C. 研究結果

### 1. 全ゲノムシーケンス：



図1に概要を示す。遺伝子地図から、リファレンス株との比較で、カエル株2株の配列に数カ所大きなギャップが見られたものの、ほぼ全ての遺伝子の配列が決定された。

## 2. 16S rRNA 遺伝子解析：

アウトグループの *Ochrobactrum* 属菌に対し、ブルセラ属は、大きく2つのクレードに分かれた。第1のクレードは、Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* から構成され、第2のクレードは、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 (げっし目) とカエル分離株2株 (A105、A141) で構成されていた (図2)。2つのクレード内での配列のホモロジーは高い (Classic・Marine クレード 99.9~100%、Novel クレード 99.7~100%) が、両クレード間ではやや低かった (99.5~99.6%) (表2)。

## 3. 多座遺伝子解析 (MLSA)：

9座の連結配列 (12,353bp) の系統樹を図3-1に、*aroA* (1,353bp)、*cobQ* (1,452bp)、*dnak* (1,914bp)、*gap* (1,008bp)、*glk* (1,032bp)、*gyrB* (2,442bp)、*int-hyp* (312bp)、*omp25* (646bp)、*trpE* (2,196bp) の各遺伝子のNJ法による系統樹を図3-2~5に示す。

12,353bpの連結系統樹では、16S rRNA 遺伝子と同様に、ブルセラ属は2つのクレードからなった。すなわち、Classic species、Marine species と *B. microti* で構成されるクレードと、カエル分離株 (A105、A141)

と *B. inopinata* を含む Novel species の2番目のクレードである。クレード内の株間のホモロジーは、Classic・Marine クレード内で高く、Novel クレード内では、それよりも低くなっていた。また、総じて、16S rRNA 遺伝子よりもホモロジーは低い値を示した (表3)。9遺伝子座、それぞれ単独配列の解析では、*glk*、*gap* ではきれいに2クレードに分かれた (図3-2)。一方、*cobQ*、*trpE* では *B. inopinata* BO1 (図3-3)、*aroA*、*dnak* では A105 (図3-4)、*omp25*、*int-hyp* では A141 (図3-5)、*gyrB* では *B. inopinata*-like BO2 が、Classic・Marine クレード寄りとなっており、2クレードに分かれるもの一様ではなく、バリエーションが認められた。

## 4. IV型分泌機構遺伝子解析：

*virB* 遺伝子群 (11,818bp) の解析結果は、16S rRNA 遺伝子、9座の連結配列と同様に Classic species、Marine species と *B. microti* でクレードが形成された。しかしながら、*B. inopinata* BO1 と *B. inopinata*-like BO2 は、最も離れて独立したクレードを形成し、カエル分離株 (A105、A141) は *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 とともにクレードを形成した (図4)。

## 5. 遺伝子診断法の開発：

*glk*、*cobQ*、*dnak* を標的にしたプライマーセットが、ヒトに感染しうる主要4菌種 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis*) およびブルセラ属菌に近縁な *Ochrobactrum* 属菌と反応せず、カエル分離株 (A105、A141) とのみ特異的に反応した。このうち、*cobQ* は異なるサイズではあるがエキストラバ



ンドが見られ、dnak は増幅効率がやや劣っていた。一方、glk を標的にした物は、最も増幅効率が良く、エキストラバンドも認められなかった（図5）。本プライマーセットは、センス、アンチセンスの3'末端側が、それぞれ「g→t」「gagg→caga」と「プリン塩基→ピリミジン塩基」の変異を反映しており、これが良い結果をもたらしたと考えられる。以上のことから、glk を標的とした本プライマーセットが、カエル由来ブルセラ属菌の有用な特異的遺伝子診断・鑑別法になることが明らかになった。

#### D. 考察

16S rRNA 遺伝子 (1,492bp) による系統解析では、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) は、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリブルセラ、*B. microtti* のクレードに対し、別クレードを形成した。しかし 9 遺伝子座の連結配列 (12,353bp) による解析では、家畜ブルセラを含むクレードは、再現されたが、それ以外の菌種は、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) のクレードと *B. inopinata* BO1 のみからなるクレードの2つに分かれた。さらにブルセラ属の主要な病原因子とされるIV型分泌機構の遺伝子である *virB* 遺伝子 (11,818bp) の解析結果では、家畜ブルセラを含むクレードは、16S rRNA 遺伝子、9 座連結配列同様にふたたび再現されたが、ノーベルブルセラについては、家畜ブルセラクレードから離れて、それぞれ進化的に遠い系統関係を示す結果になった。とくに *B. inopinata* BO1、*B.*

*inopinata*-like BO2 は、他のブルセラ属菌と離れて2株でアウトグループを形成した。

遺伝子系統解析では、より多くの遺伝子座のより長い配列を用いることで収斂現象などのノイズの影響を抑えて、より正しい系統発生を再現できることが知られている。本研究の解析結果では、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリブルセラ、*B. microtti* からなる単系統クレードは、どの配列を用いた解析でも比較的強固に維持されており、それらの菌種の進化的な近縁性は、十分に示されたと考える。また、ノーベルブルセラのなかで、どちらもオーストラリア在来の野生齧歯類分離株である *B. sp.* 83/13 と *B.sp.* NF2653 については、本研究において用いた全ての配列のホモロジーが 100%を示したことから同一菌種である可能性が示されたと考える。しかし、カエル分離株、A105, A141 については、どの配列を用いた解析でもそれぞれが異なっていた (*virB* 遺伝子群で 97.2%)。さらに、未だ自然宿主が見つかっていないヒトブルセラ症由来の *B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2 と我々のカエル株 (A105, A141) を含むノーベルブルセラグループについては、解析に用いる遺伝子配列の違いにより、異なる系統発生が再現される結果となった。

本研究に用いた輸入野性外国産カエルの分離株は、それぞれ異なる飼育施設で飼われていた原産地も種も異なるカエル (オセアニア原産のイエアメガエル・*Litoria caerulea* と東南アジア原産のデニスフロッグ・*Rhacophorus dennysi*) から分離されている。それぞれの施設で同時期に飼育されていた在来種と外国産のカエルからは、ブ

ルセラ属菌は、分離されていないため、我々の分離株2株は、それぞれの宿主のカエルが輸入前より保有していたと考えられる。異なる地域の異なる種のカエルが異なるブルセラ属菌の宿主となっている可能性がある。*B. Inopinata* の自然宿主を特定するためには、カエル株を含むノーベルブルセラ菌種の系統発生を正しく再現する必要がある、さらに多くの遺伝子座、より長い配列を用いた解析が必要であろう。

## E. 結論

愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定し、それを基に即特異的遺伝子検出法を開発した。

## G. 研究発表等

### 1. 論文発表等

(1) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症—特集・人獣共通感染症の新しい知見. in: 臨床と微生物, 近代出版, 42(1): 27-32, 2015

### 2. 学会発表等

(1) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類(カエル)に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第13回爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会ワークショップ, 相模原, 2014年11月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1.ブルセラ属菌

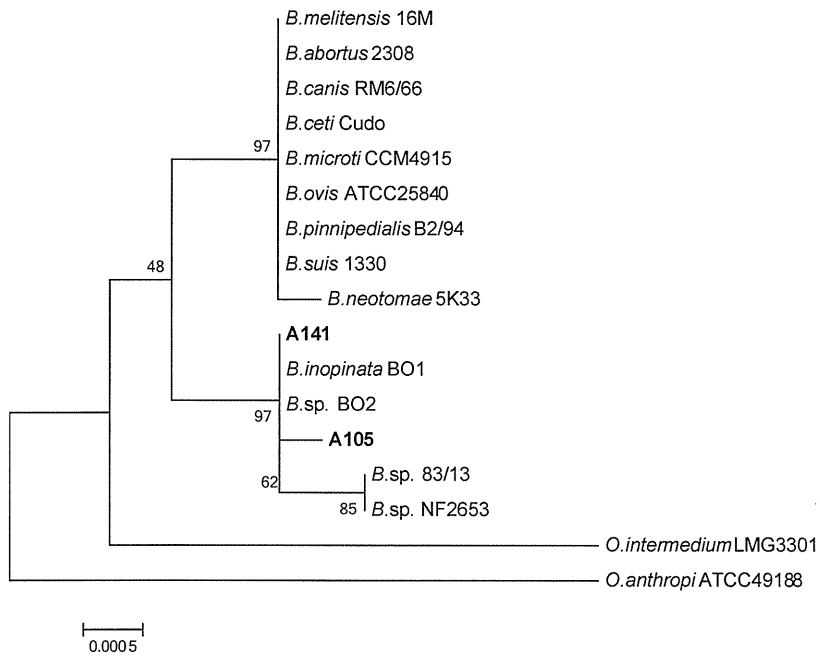
種	宿主動物	ヒトへの感染・発症
<b>Classic species</b>		
<i>B. melitensis</i>	山羊、めん羊、ラクダ	あり (最も一般的で重要)
<i>B. abortus</i>	牛、水牛、エルク	あり (次に重要)
<i>B. suis</i>	ブタ、いのしし、トナカイ、カリブー	あり
<i>B. canis</i>	犬 (イヌ科)	あり (近年、報告数が増加傾向)
<i>B. ovis</i>	めん羊	報告無し
<i>B. neotomae</i>	げっ歯目	報告無し
<b>Marine species</b>		
<i>B. ceti</i>	クジラ、イルカ	2例の患者報告あり。実験室感染例も報告あり
<i>B. pinnipedialis</i>	アザラシ、アシカ	
<b>Novel species</b>		
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、(土壌)	報告無し
<i>B. inopinata</i>	不明、(カエル?)	株名BO1、BO2の2例の報告あり
<b>(Future species)</b>		
<i>B. sp. 83/13</i> および <i>B. sp. NF2653</i>	げっし目	報告無し
<i>B. sp. NVSL 07-0026</i>	バブーン	報告無し

表2. 16S rRNA 遺伝子のホモロジー

Sequence entity Matrix  16S rRNA DNA (1,492bp)		Classic Marine species								Novel species								
		<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. suis</i> 1330	<i>B. abortus</i> 2308	<i>B. canis</i> RM6/66	<i>B. ovis</i> ATCC25840	<i>B. neotomae</i> 5K33	<i>B. ceti</i> Cudo	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	<i>B. microti</i> CCM4915	<i>B. inopinata</i> BO1	<i>B. sp.</i> BO2	A105	A141	<i>B. sp.</i> 83/13	<i>B. sp.</i> NF2653	<i>O. anthropi</i> ATCC49188	<i>O. intermedium</i> LMG3301
Classic Marine species	<i>B. melitensis</i> 16M	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. suis</i> 1330	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. abortus</i> 2308	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. canis</i> RM6/66	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. ovis</i> ATCC25840	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. neotomae</i> 5K33	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.994	0.985	0.987
	<i>B. ceti</i> Cudo	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. microti</i> CCM4915	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
Novel species	<i>B. inopinata</i> BO1	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991	
	<i>B. sp.</i> BO2	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991	
	A105	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.999	0.999	0.999	0.997	0.997	0.982	0.991	
	A141	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	1	0.999	0.998	0.998	0.983	0.991	
	<i>B. sp.</i> 83/13	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
	<i>B. sp.</i> NF2653	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
	<i>O. anthropi</i> ATCC49188	0.986	0.986	0.986	0.986	0.986	0.985	0.986	0.986	0.986	0.983	0.983	0.982	0.983	0.981	0.981	0.98	
<i>O. intermedium</i> LMG3301	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.987	0.988	0.988	0.988	0.991	0.991	0.991	0.991	0.99	0.99	0.98		



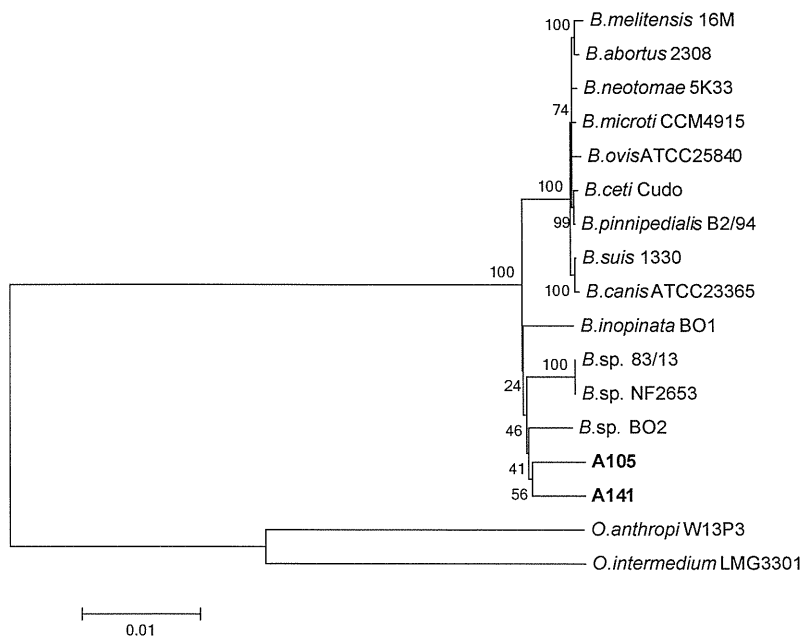
図 2 . 16S rRNA 遺伝子の系統樹解析



16S rRNA DNA (1,492bp)

図 3 . 多座遺伝子解析

図 3 - 1 . 9 座連結配列による系統樹解析



9 concatenated loci (12,353bp)

図 3 - 2 . glk 遺伝子の系統樹

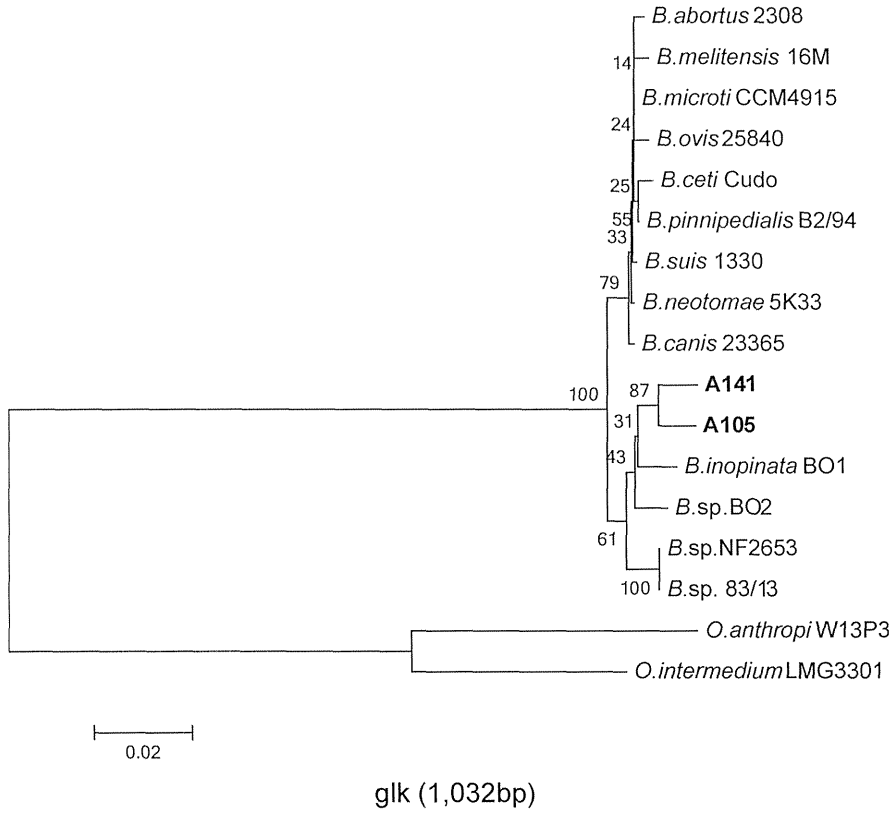


図 3 - 3 . cobQ 遺伝子の系統樹

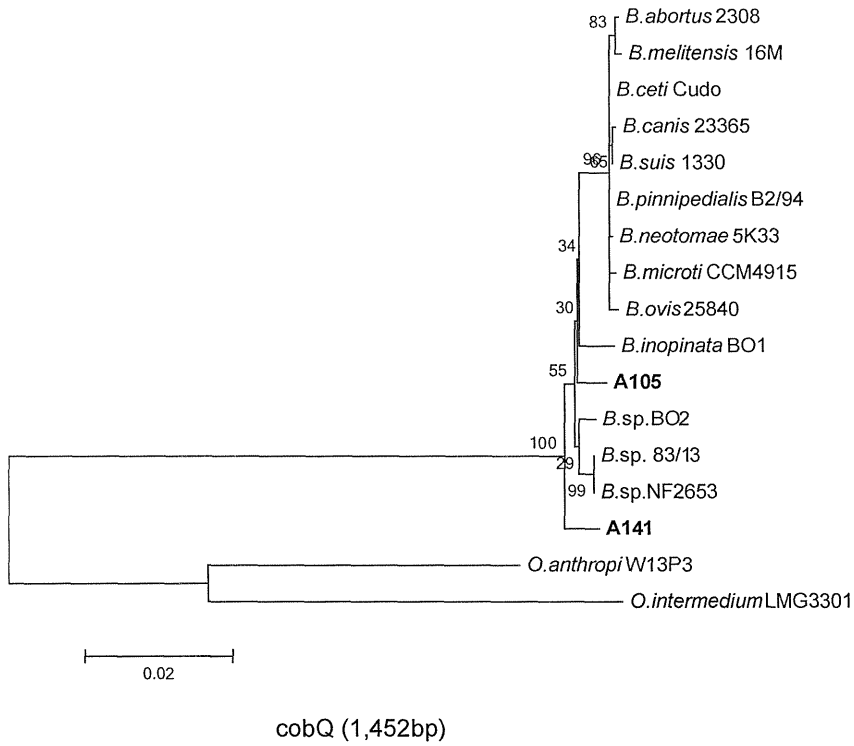
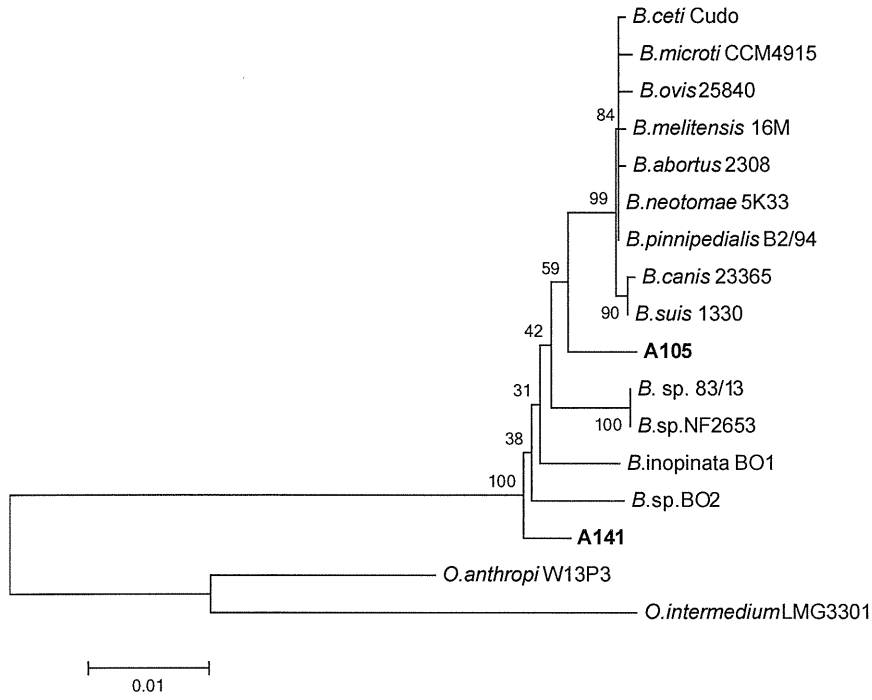
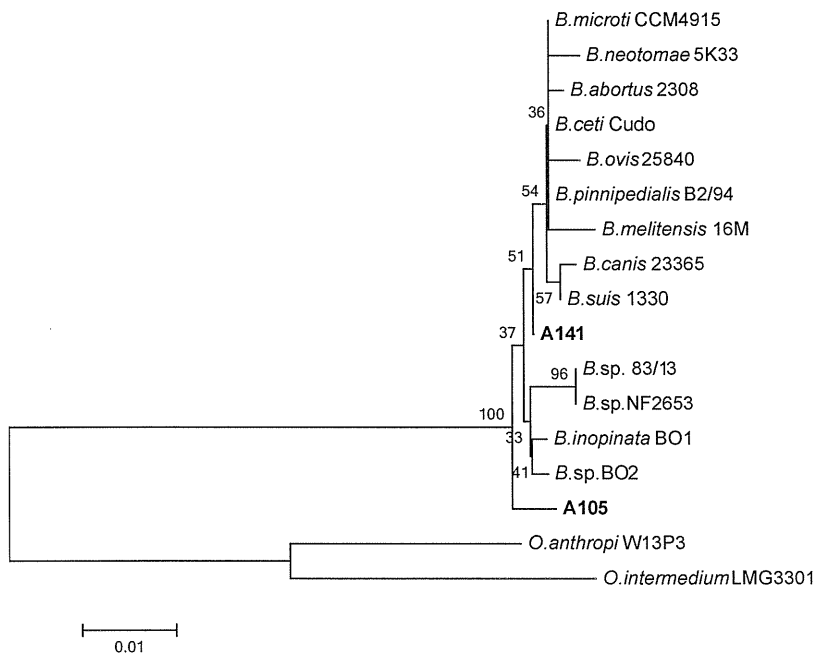


図 3 - 4 . aroA 遺伝子の系統樹



aroA (1,353bp)

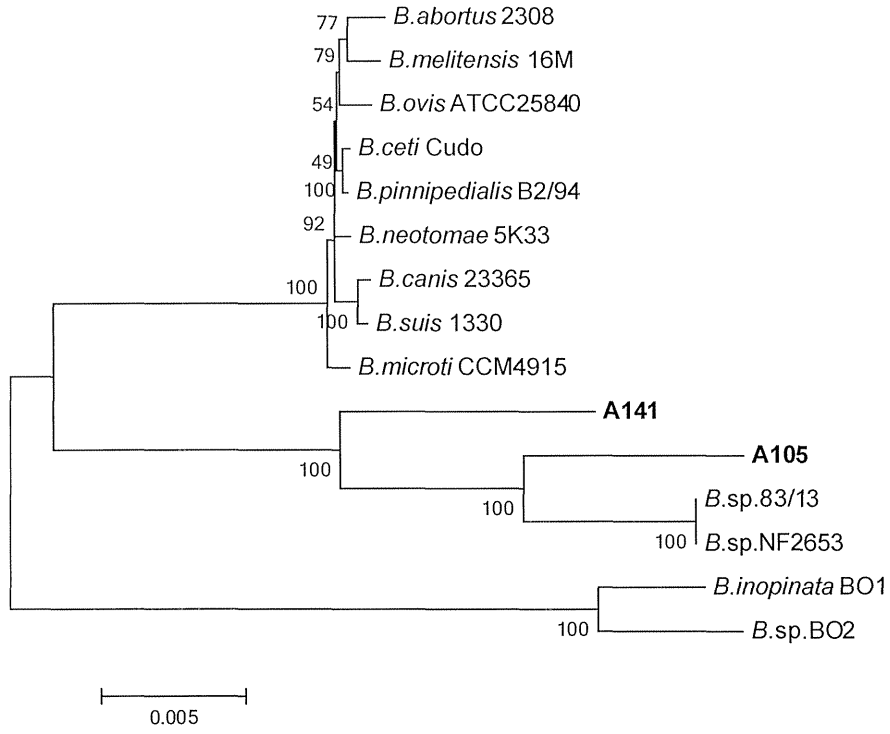
図 3 - 5 . omp25 遺伝子の系統樹



omp25 (646bp)

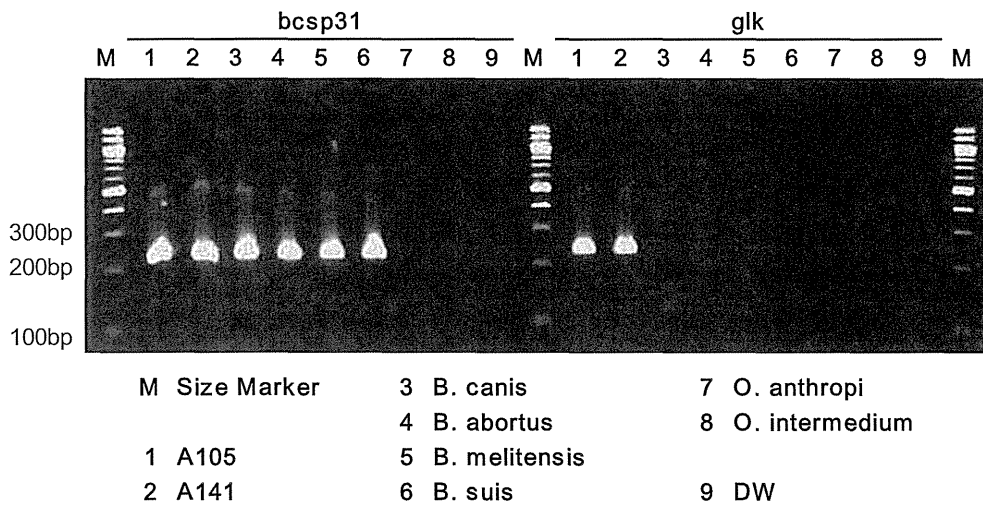


図4. virB 遺伝子群の系統樹解析



Type IV secretion system (T4SS) pathogenicity island (11,818bp)

図5. 無尾類由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法(PCR)の開発



別紙 3

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化-一般-019)

新規カプトサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法に関する研究

担当責任者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究協力者 今岡 浩一、木村 昌伸、奥谷 晶子 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨：イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の症例情報収集を行う中で、同感染症疑いの重症敗血症例 3 例から *C. canimorsus* とは遺伝子的に異なる菌株が分離された。本研究では、この新たな致死性敗血症原因菌である新規 *Capnocytophaga* 属菌について、全ゲノム解析を含む遺伝子解析および生物学的解析を行い、その性状を明らかにするとともに、鑑別診断法の開発を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 菌株は、新菌種の提唱において最も決定的なデータとなる近縁種との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70% 以上を大きく下回る 12~15% であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果を総合的に考慮して、3 株同士は同一菌種であること、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。全ゲノム解析においては、3 株それぞれのドラフトゲノムを作成した。リファレンスゲノムとした近縁種 *C. canimorsus* Cc5 株に対するリードマッピングにおけるマッピング率は、同一菌種の *C. canimorsus* 基準株の約 60% に対し、20% 前後と低かった。各コンティグのアノテーションによって、鉄獲得性因子やノイラミニダーゼなどの病原性関連遺伝子を同定した。16s rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとした、PCR 法による特異的検出法の開発では、それぞれの遺伝子について、*C. canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種には反応せず、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株を特異的に検出する鑑別診断法を確立した。

A. 研究目的：

カプトサイトファーガ属菌 (*Capnocytophaga* spp.) はヒトおよびイヌ・ネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌である。現在 8 菌種が知られており、うち 6 菌種はヒトの口腔内常在菌で、イヌおよびネコは *C. canimorsus*、*C. cynodegmi* の 2 菌種を保菌している (表 1)。いずれもヒトに病原性を有するが、公衆衛生上特に重要なのは *C. canimorsus* で、イヌやネコ

に咬傷や搔傷 (以下、咬搔傷) を受けた際に感染するほか、傷口をなめられるなど非咬搔傷性の接触感染もある。発熱のほか、敗血症、多臓器不全、播種性血管内凝固症候群 (DIC) など、局所症状がみられないまま、急激に強い全身症状が現れることが多いのが特徴である。敗血症を発症したときの致死率は約 30% に達する。

我々はこれまでに、*C. canimorsus* の特異的検出法の開発を行い、国内のイヌの 74%、

ネコの 57%が *C. canimorsus* を保菌していること明らかにし、また、国内の患者発生状況の調査によって、50 例を超える *C. canimorsus* 感染症例を把握してきた。その約 9 割が重症の敗血症例であり、国内症例の致死率も約 25%と、救命救急医療の環境が整ったわが国においても、依然救命の難しい感染症であることが明らかとなった。

さらに、この調査・研究の過程で、従来の *C. canimorsus* 特異的 PCR 検出系では陰性となる、遺伝子的に異なる新菌種と思われる新規 *Capnocytophaga* 属菌による敗血症例 3 例（うち死亡 1 例）が見い出された。本研究は、イヌ・ネコを感染源動物とすることが推測される、この新たな致死性敗血症原因菌について、遺伝子解析や生物学的解析を行い、鑑別診断法を開発することを目的として遂行した。

## B. 研究方法：

敗血症患者由来新規 *Capnocytophaga* 属菌の生物学的解析

国内で *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された 3 株の新規 *Capnocytophaga* 属菌臨床分離株を解析に供した。菌が分離された症例は 2011 年の 1 例（HP40001 株）と 2014 年の 2 例（HP20001 株、HP33001 株）であり、症例のプロファイルは表 2 に示した。

### 1. 理化学分析

HP40001 株と *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 株、HP40001 株と *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の組み合わせで、1 対 2 の DNA-DNA ハイブリッド形成試験をマイクロプレート法によって行った。

### 2. 遺伝子解析

16S rRNA および *gyrB* 遺伝子のそれぞれ 1500bp 弱の領域を増幅して塩基配列

を決定し、結果を近縁種のデータと比較して近隣結合法（NJ 法）による分子系統解析を行った。さらに、次世代シーケンサー Miseq（illumina 社）を用いて全ゲノムを解析し、得られたリードの *de novo* アセンブリを行うとともに、国立遺伝学研究所の解析ツール MiGAP を用いて、得られたコンティグに対するアノテーション付与を行った。また、ゲノムデータベース上の *C. canimorsus* Cc5 株の全ゲノム情報をリファレンスとしたリードマッピングを行った。

### 3. 生理・生化学的性状試験

オキシダーゼテスト、カタラーゼテストを常法に従って行った。また、生化学的性状試験の各項目を ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」（日水製薬）、API20A および APIZYM（シスメックス・バイオメリュー）の各検査キットを用いて調べた。

### 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

シーケンスデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマー群を設計し、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株と *Capnocytophaga* 既存菌種基準株を用いて各プライマーの組み合わせによる検出の特異性を検討、鑑別診断に有用なプライマーセットを選定した。PCR は puReTaq Ready-To-Go PCR Beads（GE Healthcare）を用い、GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）で行った。

## C. 研究結果：

### 1. 理化学分析

DNA 塩基組成測定では、G+C 含量が約 35%であり、*Capnocytophaga* 属の特徴（34～44%）と一致した（表 3-1）。

HP40001 株を代表株として行った、菌種の分類において最も決定的な指標となる DNA-DNA ハイブリッド形成試験の結果は、同一菌種の基準となる相同値 70% 以上に対して、対 *C. canimorsus* 基準株で相同値 12~15%、対 *C. cynodegmi* 基準株で相同値 12~13% という結果であり、HP40001 株は新菌種であると判断された (表 3-2)。

## 2. 遺伝子解析

2011 年にネコ搔傷敗血症例から分離された菌株 (HP40001) および本年度、*C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例 2 例 (うち死亡 1 例) から分離された 2 株 (HP20001、HP33001 の計 3 株は、*C. canimorsus* 基準株に対して 16S rRNA で 96.9~97.0%、*gyrB* 遺伝子で 75.5~75.6% と低い相同値を示し、またデータベース上には *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* よりも類似した配列が存在しなかった (表 4-1)。一方、この 3 株同士は 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子ともに塩基配列の相同値が 99% 以上であり、系統解析の結果、この 3 菌株は同一菌種であり、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種である可能性が高いと判断された (表 4-2、図 1-1、1-2)。全ゲノム解析を行った結果、HP20001 株ではコンティグ数 245、平均コンティグサイズ 11.0kb、N50 (コンティグ長の加重平均) =18.5kb、HP33001 株ではコンティグ数 572、平均コンティグサイズ 4.8kb、N50=7.3kb、HP40001 株ではコンティグ数 2140、平均コンティグサイズ 1.1kbp、N50=1.7kb のドラフトゲノムデータが得られた (表 5-1)。リファレンスとして *C. canimorsus* Cc5 株の完全ゲノム情報を用いリードマッピングを行ったところ、同一条件設定で *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 が約 61% のマップ率だったの

に対して、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は 17~24% のマップ率と低く、これは *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の約 22% と同程度で、*Capnocytophaga* 属菌 3 株は *C. canimorsus* とはゲノムレベルで他菌種相当の差異があることが示唆された (表 5-2、図 2-1)。

各コンティグに対するアノテーションでは、*C. canimorsus* が保有し病原性に関わるとされるノイラミニダーゼや、宿主体内での鉄獲得に関わる因子など、新規 *Capnocytophaga* 属菌の病原性に関わる可能性のある遺伝子が同定された。

## 3. 生理・生化学的性状試験

*Capnocytophaga* 既存菌種と同様、二酸化炭素要求性で、大気中濃度の CO<sub>2</sub> では全く生育せず、5%CO<sub>2</sub> 存在下では良好に生育した。

オキシダーゼおよびカタラーゼ試験はともに陽性で、イヌ・ネコが保菌する *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* と同様の性質を示した (これに対してヒト保有の 6 菌種はいずれも陰性)。各試験項目における 3 株間の差異は HP20001 株がマルトース分解陽性を示した点のみで、生化学的性状は 3 株ともほぼ一致した (表 6)。

*C. canimorsus* との鑑別点としては、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株がいずれも  $\gamma$ -グルタミルアミノペプチダーゼ陽性であったのに対し、*C. canimorsus* は基準株および国内臨床分離株 28 株はいずれも陰性であり、病院検査室で実施できる同定試験における鑑別点と考えられた。

## 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

16S rRNA 遺伝子をターゲットとした検出では、プライマー F1 と R2 のセットが、*gyrB* 遺伝子をターゲットとした検出

では F2 と R2 のセットが、特異性、感度においてそれぞれ最も良好な結果を示した。両プライマーセットを用いた PCR では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株はいずれも陽性となり (図 3-1)、最も近縁な *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* を含む既存菌種はいずれも陰性となった (図 3-2)。

#### D. 考察：

*C. canimorsus* 感染症について調査を継続する中で情報の得られた、1 例の死亡例を含む 3 例の *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された菌株は、既知の *Capnocytophaga* のいずれの菌種とも異なるプロファイルを有しており、新菌種であることが示唆されたことから、本研究において詳細な解析を実施した。

分類学上の新菌種を提唱するためには、所定の性状解析が必要であるため、DNA-DNA ハイブリッド形成試験や生理・生化学的性状解析等の各種の詳細な解析を実施した。その結果、これら 3 株を同一の新菌種として正式な提唱するために十分なデータが得られた。

ゲノム解析では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株のドラフトゲノムを作成することができた。*Capnocytophaga* 属菌はリファレンスに利用できるデータが乏しく、まだこれから既存菌種を含めて多くの菌株のゲノムデータを蓄積して将来的な詳細な解析の土台を作る段階であるが、今回の解析で、鉄獲得性因子など病原性因子を含む遺伝子の同定がある程度できたことで、今後、発症メカニズムの解析に利用できるデータが得られた。

新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は、検査時に *C. canimorsus* 検出系では 16S rRNA 遺伝子検出 PCR 陽性、*gyrB* 遺伝子検出 PCR 陰性となるため、既知の *C.*

*canimorsus* と PCR の検査結果に差は認められるが、新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的に陽性を検出する PCR 検査系を確立する必要性から、今回の解析によって得られたデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマーを設計することにより、新規 *Capnocytophaga* 属菌両遺伝子のみを特異的に検出する PCR 法による鑑別診断系が確立された。

今後の課題としては、現在 3 例のみが把握されている新規 *Capnocytophaga* 属菌による患者発生状況を継続的に調査し、実態を解明することをはじめ、これまでの 3 症例には、いずれもネコ咬搔傷歴やイヌとの接触歴があり、イヌ・ネコから感染したことが推測されたものの、直接的証拠はないことから、イヌ・ネコの保菌状況について、調査することがまず必要と考えられる。

これらの調査には、今回確立した PCR による鑑別診断法が極めて有用となる。さらには、今回解析した菌株のゲノム情報を元にした病原遺伝子の検索や発症メカニズムの解析、また臨床分離株を収集して薬剤感受性試験や生化学的性状試験を実施し、抗菌薬の選択や検査室の菌種同定システムへの情報提供を行うなど診断・治療に貢献できる可能性のある課題が多くある。

また、新規 *Capnocytophaga* 属菌は日常生活に身近なイヌ・ネコが保菌していることが推測されることから、医療関係者のみならず、一般市民に対しても、積極的なアウトリーチ活動を通じて情報の周知を図っていくことが重要と考えられる。

#### E. 結論

いずれも重症の敗血症例から分離された、新菌種と考えられる *Capnocytophaga*