

分担研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立

所属 国立感染症研究所真菌部
研究分担者 梅山隆

研究要旨

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。本研究は、臨床検体からコクシジオイデス属などの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を開発し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、LAMP 法による *Cryptococcus gattii* DNA の高感度検出系の開発を検討した。

研究協力者

名木稔, 星野泰隆, 宮崎義継 (国立感染症研究所真菌部)

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植、抗癌剤治療などの免疫不全患者のみでみられる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症、ヒストプラスマ症などは健常者に起こることが知られており、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が増してきた。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*) とヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 等が想定される。いずれの真菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染に進行すると致死率は極めて高くなるが、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海外の流行地への渡航歴のないヒストプラスマ、クリプトコックス・ガッティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。また、コクシジオイデス属、ヒストプラスマ属については、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養は飛散胞子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全か

つ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、*Cryptococcus gattii* の簡便かつ高感度な検査法として、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の検討を行った。

B. 研究方法

Cryptococcus gattii 検出のための LAMP 法の標的配列として、*Cryptococcus* 属の莢膜の生合成に関する *CAP10* 遺伝子の配列を選択した。LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) を利用して数組設計した。その他、既に論文で報告されている *CAP59* (Lucas S et al., Clin. Microbiol. Infect., 2010)、もしくは *URA5* (Amirabadi AR et al., Af. J. Biotechnol. 2012) を利用した LAMP プライマーについても検討した。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キット (乾燥型) および検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200 µl PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63 で反応を行った。*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出した DNA を用いて検討を行った。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

【倫理面への配慮】

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

C. 研究結果

最初に、既に論文に報告されている *CAP59* の配列

を利用した LAMP 法の導入を試みた。 *C. neoformans* (血清型 A および D) もしくは *C. gattii* (血清型 B および C) の 2 菌種を区別することが出来る LAMP プライマーとして報告されている。論文中の塩基配列を参考にプライマーを合成し、 *C. neoformans* H99 株および *C. gattii* R265 株から抽出したゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った。1 時間の反応では、 *C. neoformans* もしくは *C. gattii* を特異的に検出することが出来たが、2 時間の反応では、水のみ陰性コントロールにおいて検出されており(データ未掲載)、本プライマーによる検出系ではバックグラウンドが高い可能性が高く、高感度検出系としては不適當であることが示唆された。

次に、別の論文で報告されている *URA5* の配列を利用した LAMP 法の導入を試みた。また、 *CAP10* 遺伝子の配列を利用して 4 種類の LAMP プライマーセットを設計した。すべてのプライマーセットにおいて、1 時間以内に検出可能であった(図 1)。中でも *CAP10-25-Cg* および *CAP10-25-Cn* プライマーセットでは 30 分で検出可能であった。また、 *CAP10-13-Cn* プライマーセットを用いると、 *C. neoformans* 特異的な検出が可能であった。いずれも、水のみ陰性コントロールにおいては、2 時間後でも検出されなかった。

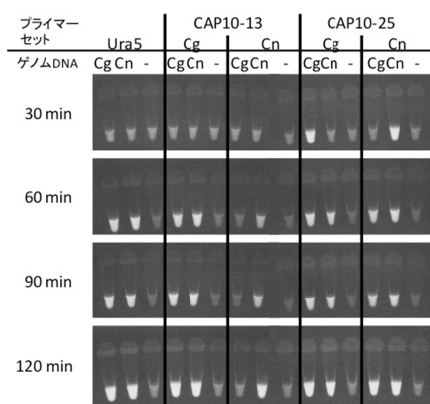


図 1. *C. neoformans* (Cn, H99 株) および *C. gattii* (Cg, R265 株) のゲノム DNA を用いた LAMP 法プライマーセットの検討

D. 考察

ヒストプラスマ属やコクシジオイデス属などの BSL3 真菌、クリプトコックス・ガッティ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 法の反応系は非常に簡素で、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、1 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 法を用いればクリプトコックス属を迅速簡便に検出できる。現時点ではクリプトコックス属の菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、今後、特異性や検出感度について検討し、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、今後実験系の改良を進めていきたい。

E. 結論

LAMP 法によるクリプトコックス・ガッティの迅速診断系のためのプライマーセットを開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yurika Ikeda-Dantsuji, Hideaki Ohno, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Keigo Ueno, Minoru Nagi, Satoshi Yamagoe, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki. Interferon- promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21: 831-836, 2015
- 2) Shotaro Okachi, Keiko Wakahara, Daizo Kato, Takashi Umeyama, Tetsuya Yagi, Yoshinori Hasegawa. Massive mediastinal cryptococcosis in a young immunocompetent patient. *Respirology Case Reports*. 3 : 95-98, 2015

2. 学会発表

- 1) 梅山隆, 中村茂樹, 山越 智, 名木稔, 壇辻百合香, 中山靖子, 浦井誠, 金城雄樹, 上野圭吾, 星野泰隆, 宮崎義継, 治療薬選択に必要な真菌の菌種同定, 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 札幌, 10 月 9-10 日, 2015

G. 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

厚生労働科学研究補助金 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)
分担研究報告所

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

所属 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究分担者 黒田誠

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.その危険性に対処する確な対処法を立案・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な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 の系統的な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.本年度は GcoGSA-BA による情報解析で,炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた.

2014 年の Dengue 熱感染症・国内発症例を契機に,輸入感染症による国内拡大にも注視すべき事情が生じ,2020 年東京オリンピック対策にも資する Dengue ウイルス遺伝型を可視化するツール Dengue Genograph Viewer (DGV) を構築した.多様な輸入感染症が国内例として散見されると想定され,恣意的なバイオテロのみならず, Dengue ウイルス等の外来ウイルスも検討課題として引き続きデータベース拡充を行っていく.

研究協力者

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)
奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

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.

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.最先端の革新技术を応用し,効率の良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

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

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

現在、感染研・ゲノムセンターにベンチトップ型・次世代シーケ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 Global core genome SNP analysis for *Bacillus anthracis* (GcoGSA-BA)

を開発した。炭疽菌ゲノム 5.23 Mb 全体に渡り特徴的な塩基アレール 657,183 箇所を用いたゲノム分子系統樹を作成できる。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。炭疽菌は *Bacillus cereus* group に属し、セレウス菌との鑑別間違いを起さぬよう、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。本年度は GcoGSA-BA による情報解析で、炭疽菌を含むセレウス属グループ全般の病原性因子の特定も可能になる改良を加えた(表 1)。

2) ウイルスの発生分布を遺伝型として地図上に図示化する

感染症のグローバルな伝播を把握するためには当該病原体の遺伝型を把握することが先決である。インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm がほんの数ヶ月で世界中を駆け巡った事実は記憶に新しく、国立感染症研究所・椎野博士の報告によると、国内分離株のゲノム分子系統解析から 2009 年 5 月下旬には様々な防疫体制を超えて複数系統の A(H1N1)pdm が国内に侵入・伝播し、6 月にはパンデミック状況になっていたことが示された。本報告は病原体ゲノム情報に付随する疫学情報(時系列と地域)を十分に精査した点で特筆すべき解析結果であり、パンデミック状況を分子疫学の観点から考察した精度の高いトレーサビリティである。

アウトブレイクは元となる汚染源が必ずどこかに存在し、危機管理対応として被害を最小限に留めるために汚染源の特定は必須である。それ故、出来る限り病原体の遺伝型特定は行なっておきたい。海外か

らの来訪者が増えつつある日本において、2014 年夏のデングウイルスの国内症例を経験した今、病原体の由来特定は重要になってきている。そこで我々は公開データベースに登録されている全てのデングウイルス配列(1945 -2014 年)を収集し、分離国・地域と血清型および遺伝型としてデータベース化し Google Maps 上で表現できるよう作成した(図 1)。血清型 2 と 4 しか図には示していないが、一目瞭然、ある特定の遺伝型ごとに大陸によって生息分布が制限されている。そもそもデングウイルスは蚊媒介感染症であり、中間宿主の蚊の種類を生息域に制限されることが主要因であろう。このデータベースを有効に活用すれば、患者個々の感染デングウイルス株をゲノム情報として取得し、この Dengue Genograph Viewer (DGV) デング・データベース上で検索すれば最も近縁のデングウイルスを検出することができる。残念ながら、現在の公開配列データベースが完全に世界のデングウイルス情報を網羅しているわけではなく、今後、書庫としてのデータベースの更なる充実が期待される。

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。さらにデングウイルスの分離地域を図示化した Dengue Genograph Viewer を開発し、ゲノム配列を基盤にした分子疫学解析が由来特定にとって非常に有効であることが一目瞭然として理解される。NGS 解読において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、誰もが簡単に利用できるシステムが先行していけば、シーケ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. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 黒田誠 微生物ゲノミクスと公衆衛生学的活用 第 89 回日本感染症学会学術講演会 モーニングセミナー 2 京都 (2015.4)
- 2) 黒田誠 NGS 技術による病原体ゲノム情報の大量取得と分子疫学解析への応用 第 158 回日本獣医学会学術集会・シンポジウム 十和田市 (2015.9)
- 3) 黒田誠 NGS を応用した感染症診断の可能性 第

表1 GcoGSA-BA に追加した*Bacillus cereus* の病原性因子のリスト

Capsule genes	gene	product	locus_tag	Reference
cap operon	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, complete sequence			
	capB	poly-gamma-glutamate synthase PgsB	GBAA_RS28250	
	capC	poly-gamma-glutamate biosynthesis protein PgsC	GBAA_RS28245	
	capA	capsule biosynthesis protein CapA	GBAA_RS28240	
	capD	capsular polysaccharide biosynthesis protein	GBAA_RS28235	
bpsX operon	Bacillus cereus G9241 plasmid pBC218 cont1893, whole genome shotgun sequence			Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	pBC218_0073	glycosyl transferase group 2	NC13_RS05360	PNAS June 1, 2004 vol. 101 no. 22 8449-8454
	pBC218_0072	polysaccharide polymerase	NC13_RS05355	
	pBC218_0071	glycosyl transferase WecB/TagA/CpsF family	NC13_RS05350	
	pBC218_0070	hypothetical protein	NC13_RS05345	
	pBC218_0069	hydrolase/polysaccharide capsule synthesis protein	NC13_RS05340	
	pBC218_0068	hypothetical protein	NC13_RS05335	
	bpsX	LytR family transcriptional regulator	NC13_RS05330	
	bpsA	chain length determination	NC13_RS05325	
	bpsB	tyrosin protein kinase	NC13_RS05320	
	bpsC	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	NC13_RS05315	
	bpsD	glycosyl tranferase	NC13_RS05310	
	bpsE	sialic acid synthetase	NC13_RS05305	
	bpsF	UDP-N-acetylglucosamine 2 epimerase	NC13_RS05300	
	bpsG	CMP-sialic acid synthetase	NC13_RS05295	
	bpsH	polysaccharide translocase	NC13_RS05290	
	Bacillus cereus G9241 map unlocalized plasmid pBCXO1 cont1908, whole genome shotgun sequence			
has operon	hasA	presumed hyaluronan synthase	pBCXO1_0108	Mol Microbiol. 2011 April ; 80(2): 455-470. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	pBCXO1_0109	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	pBCXO1_0110	
	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, complete sequence			
	hasA	presumed hyaluronan synthase	GBAA_RS28975	
	hasC	UDP-glucose-pyrophosphorylase	GBAA_RS28980	
	hasB	UDP-glucose dehydrogenase	GBAA_RS28985	
B. cereus virulence genes				
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
enterotoxin	hblB	hemolysin BL binding component precursor	BC3101	
	hblA	hemolysin BL binding component precursor	BC3102	
hemolysin	hblC	hemolysin BL lytic component L2	BC3104	
	hblD	hemolysin BL lytic component L1	BC3103	
	nheA	non-hemolytic enterotoxin lytic component L2	BC1809	
	nheB	non-hemolytic enterotoxin lytic component L1	BC1810	
	nheC	enterotoxin C	BC1811	
	cytK	cytotoxin K	BC1110	
	enterotoxin1	enterotoxin / cell-wall binding protein, entFM	BC0813	
	enterotoxin2	enterotoxin	BC1953	
	enterotoxin3	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC2952	
	enterotoxin4	enterotoxin / cell-wall binding protein	BC5239	
	hlyA	hemolysin A	BC4175	
	hlyII	hemolysin II	BC3523	
	hlyIII	hemolysin III	BC2196, BC5449	
	cerA	cereolysinA/phospholipaseC	BC0670	
	cerB	cereolysinB/sphingomyelin phosphodiesterase	BC0671	
	clo	cereolysinO/clo/perfringolysin O precursor	BC5101	
phospholipases	PI-PLC	phosphatidylinositol-specific phospholipaseC	BC3761	
proteases	ColB	collagenase	BC0556	
	Bacillus anthracis str. Ames chromosome, complete genome			J. Bacteriol. June 2004, p. 3531-3538
plcR	trunca plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BA_5595	
	Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome			
	plcR	pleiotropic transcriptional regulator	BC5350	
	Bacillus cereus plasmid pBCE4810			BMC Microbiology 2006, 6:20 doi:10.1186/1471-2180-6-20
cereulide	cesA	cereulide synthetase A	gene 6845..17020	
	cesB	cereulide synthetase B	gene 17034..25079	

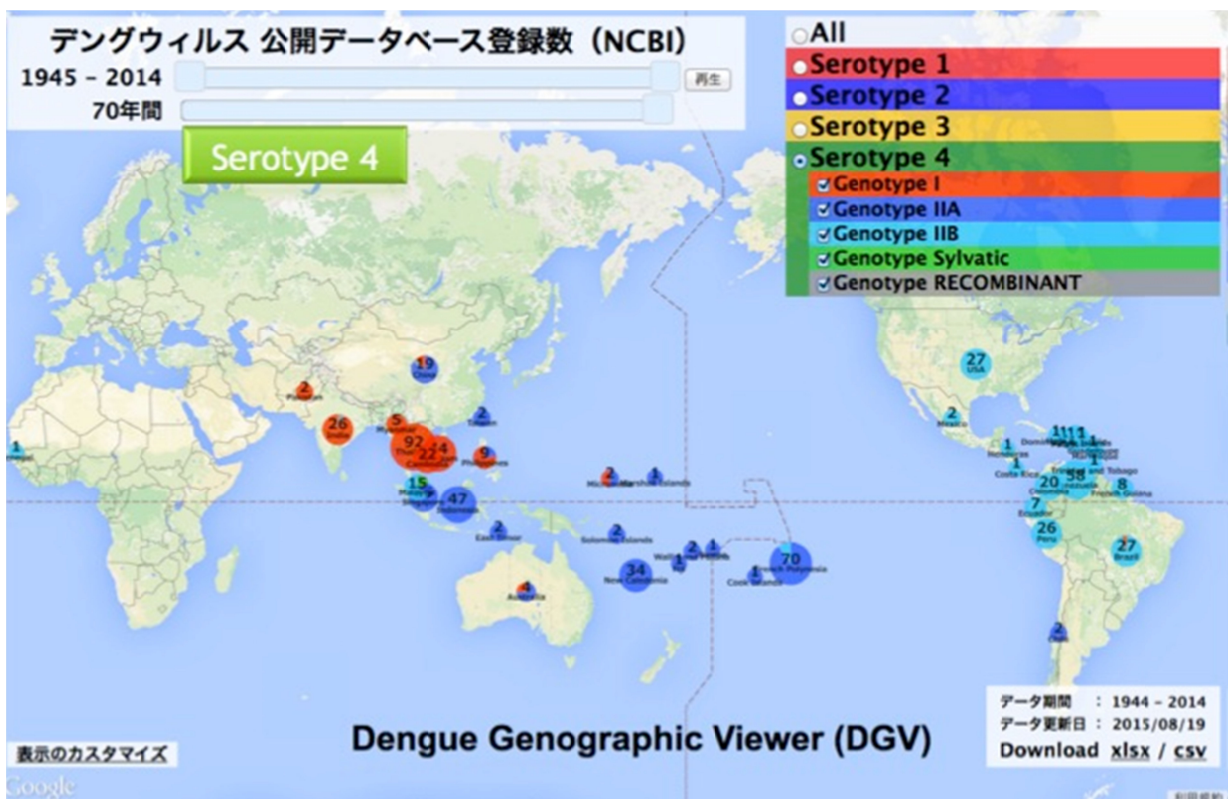
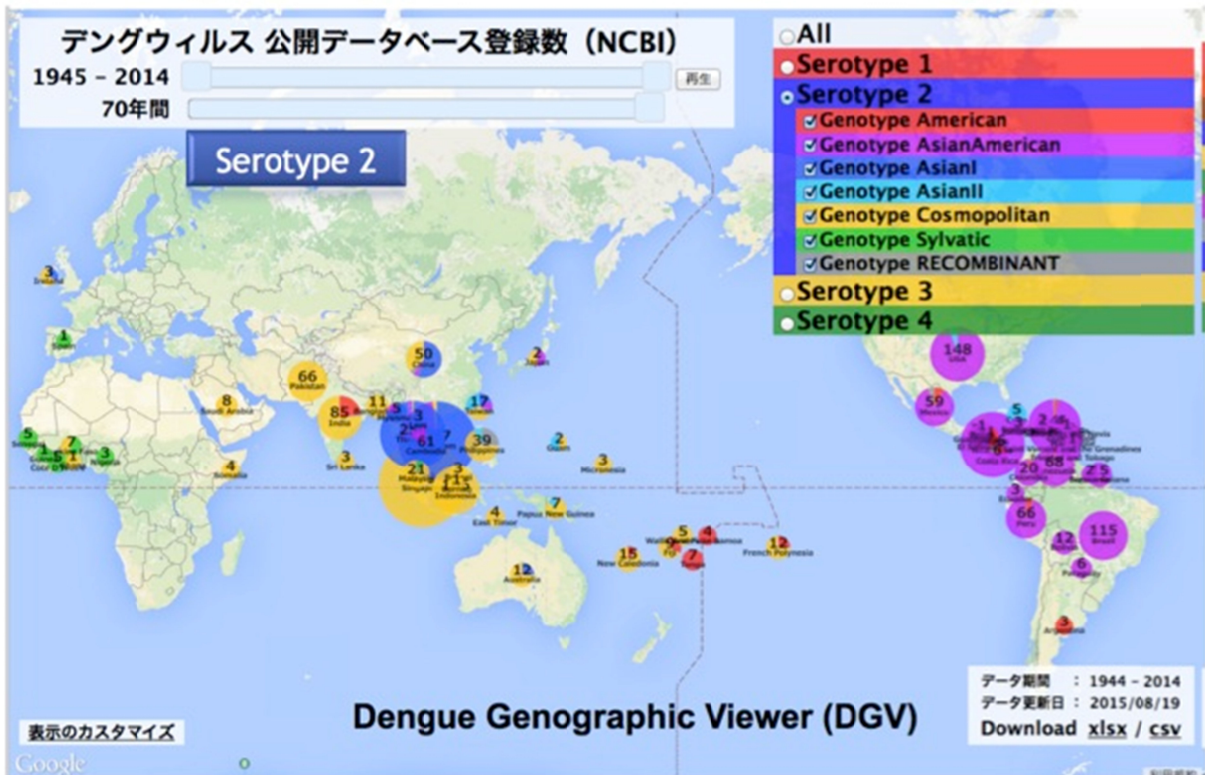


図1 デングウイルス配列(1945 -2014年)の分離国・地域と血清型および遺伝型データベース (図では血清型2, 4の遺伝型分布のみ表示)