

24. 日本紅斑熱を中心としたダニ媒介感染症のゲノム解析体制の整備に関する研究

○荻田 堅一（旧所属：兵庫県立健康科学研究所感染症部 現所属：兵庫県動物愛護センター）

【研究目的】

ダニ媒介感染症は、国内では重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、日本紅斑熱、つつが虫病が多く発生している。これらの進化と宿主への適応の研究や新しい治療法の開発などに向けて、ゲノム解析はますます重要となると予測されるが、各地方衛生研究所ではゲノム解析実施体制が整備されていないところが多い。そのため、近年増加傾向にあり検体数も多い日本紅斑熱を中心としたゲノム解析実施体制の整備を目的として本研究を実施する。

【研究の必要性】

病原体を保有したマダニに刺咬されることによって感染するダニ媒介性感染症のうち、日本において主にみられるものとして、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、日本紅斑熱およびつつが虫病があげられる。特に、SFTS と日本紅斑熱は患者報告数の増加や発生地域が拡大傾向にあることがニュースでもたびたび取り上げられ、社会的に問題となっている。これらの原因は明らかになってはいないものの、里山の減少により野生動物が人の生活圏に下りてくることが増えたこと、昨今のアウトドアブームによりマダニの生息する山林や草むらに入る機会が増えたことなどが挙げられる。現在、これらの実験室内診断は主に各地方衛生研究所が中心となって遺伝子検査や血清抗体検査により実施しているところである。

一方、上記以外にも、エゾウイルスやオズウイルスといった新興ダニ媒介性ウイルス感染症や日本紅斑熱以外の新規リケッチャ感染症の発生が少数であるものの報告されている。また、マダニの野外調査などによって、SFTS や日本紅斑熱に近縁な新種のウイルス・リケッチャも新たに報告されてきている。このような未知のあるいは希少な病原体に対しては、特定の遺伝子をターゲットとする従来の PCR 法を主体とした検査だけでは十分な対応が困難であり、そのため次世代シーケンサを用いたゲノム解析体制を整備しておく必要がある。

【研究計画】

(1) ゲノム解析体制の確立

日本紅斑熱リケッチャ (*R. japonica*、以下 Rj とする) は増殖に宿主細胞を必要とする。宿主細胞を用いた臨床検体からの Rj の分離培養手技を当研究所で冷凍保管している Rj 株を使用して検討する。ゲノム解析については、MiSeq によるショートリードと MinION によ

るロングリードを合わせて完全長ゲノム配列を得る計画であったが、研究期間内での機器・試薬の調達が困難なことが判明した。そこで、ライプラリー試薬として、ライプラリー中に特異的な短い塩基配列を組み込み、それをターゲットにすることで疑似的に長いライプラリーを形成し、MiSeqにおいてもロングリードと同等の解析が行うことが可能な TELL-SeqTM Library Reagent Kit を代わりに使用することとした。

(2) 臨床検体を用いたゲノム解析の実施

当研究所に日本紅斑熱、つつが虫病の検査依頼で搬入された臨床検体について、(1)で標準化した方法でゲノム解析を試みる。まずは 2023 年度に搬入され、PCR 検査で陽性となったものを対象とし、日本紅斑熱 13 検体、つつが虫病 4 検体を解析する。

【実施内容・結果】

臨床検体からのリケッチアの分離培養

事前に当所で保管してある Rj 株の培養を実施し、増殖を確認した上で、同様の方法で臨床検体からのリケッチアの分離培養を試みた。臨床検体は、2023 年度および 2024 年度に日本紅斑熱およびつつが虫病の行政検査として健康福祉事務所等から搬入され、PCR 法で陽性となった患者 13 名のうち、-80°C で冷凍保管され、凝固防止した急性期血液 11 検体、痴皮 9 検体、皮膚生検 2 検体を用いた。なお、痴皮および皮膚生検は、搬入時に細切し、ペッスルでホモジナイズした後、適当量の滅菌 1×PBS (-) で懸濁した溶液をスクリューキャップチューブに入れて冷凍保管していた。

臨床検体は 100 μl を 1×PBS (-) で遠心洗浄後、DMEM 1ml で再懸濁し、L929 細胞に接種した。1 時間培養後に培地を回収して 1×PBS (-) で洗浄し、新しい DMEM に交換して 2~3 週間培養した。Rj の増殖がみられないときは培養した細胞を回収し、1/3 量程度を再度 L929 細胞に接種し 2 繼代目まで培養を継続した。

急性期血液 1 検体から Rj の分離が確認された。痴皮および皮膚生検からは Rj の分離は確認されなかった。また、いずれの検体からもつつが虫病リケッチアの分離は確認されなかった。

Rj が分離された患者は兵庫県内に在住しているが、感染症動向調査(NESID)のデータによると、感染地域は長崎県内、発病日から 4 日後の 2024 年 10 月 23 日に採取された検体のことであった。

DNA 抽出

分離が確認された Rj からの DNA 抽出の前処理として以下の操作を行った。回収した培地を 17000 × g で 10 分遠心分離し上清を廃棄し、沈渣は 1×PBS (-) で再浮遊した。これに 29G

注射針を付けた注射筒で吸引吐出を数回繰り返し、細胞を破碎した。1000×g で 10 分遠心分離して上清を回収し、DNA 抽出用の材料とした。

ロングリードのデータを得るために可能な限り長いゲノムが必要になるため、DNA 抽出には NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) をマニュアルに準じて使用した。得られた DNA 抽出液は使用まで-20°Cで冷凍保管した。

ゲノムシーケンシング

ライブラリー調整は、TELL-Seq™ Library Reagent Kit (Universal Sequencing Technology) をマニュアルに準じて使用した。シーケンシングランは MiSeq (Illumina) を使用し、300 Cycles の Paired-End で行った。

ゲノム解析

TELL-Seq™ Library Reagent Kit を使用したライブラリーから得られたリードデータの解析には専用のパイプラインソフトウェアが用意されている。今回は、シーケンスデータを fastq データに変換する TELL-READ、マッピング解析での変異検出を行う TELL-SORT 、 de novo assembly 解析を行う TELL-LINK を使用した。参照配列には YH_M 株 (ACCESSION: NZ_AP017602.1) を使用した。TELL-LINK の結果、6 個の contig が得られた。この contig を国立遺伝学研究所のオンラインサービス DFAST を利用してアノテーションを行った結果の概要を表 1 に示した。

Total Sequence Length (bp):	1279295
Number of Sequences:	6
Longest Sequences (bp):	866800
N50 (bp):	866800
GCcontent (%):	32.3
Number of CDSs:	1381
Coding Ratio (%):	79.2
Number of rRNAs:	3
Number of tRNAs:	33

表 1 アノテーション結果

TELL-SORT の結果を図 1 に示した。snp と indel の数はそれぞれ 62 と 17 であった。

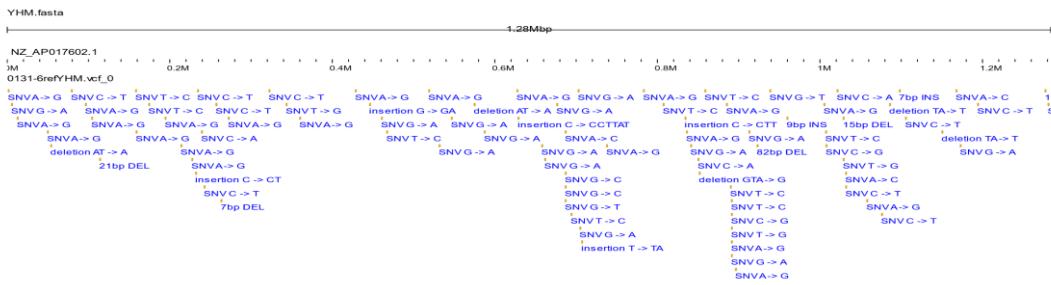


図1 R. japonica YH_M株に対する変異箇所

【考察と今後の課題】

当所で保管している Rj 株の培養が確認できたため、同様の方法により臨床検体からのリケッチャの分離培養を試みたが、Rj は急性期血液 1 検体からしか分離できなかつた。血液サンプルにおける Rj の検出率は皮膚サンプルよりも全体的に低いという報告³⁾もあり、発症後の患者血液からの分離は困難であることが再確認された。一方、痂皮や紅斑部の皮膚生検は PCR 検出率が血液よりも高いため、Rj の分離培養可能な検体として期待が高かつたが、本研究において分離は確認できなかつた。また、痂皮は 11 検体中 6 検体において、培養数日で他の細菌によるコンタミネーションがみられ、途中で培養を中止せざるを得なかつた。これに関しては、適切な抗菌剤を使用することでコンタミネーションを防止することができれば分離率の向上が見込める可能性もあるため、今後の検討課題としたい。

今回、TELL-Seq™ Library Reagent Kit を用いたゲノム解析で得られた contig の概要は表 1 のとおりであり、データは示していないが、QUAST によるアセンブリの評価も概ね良好な結果であった。しかしながら、反復配列が存在する領域を含めた 5 か所の gap が存在し、このデータだけでは完全長ゲノム配列の取得には至らなかった。一般的に、反復配列を含む領域をショートリードによる解析で正確な配列を決定することは難しいとされている。本研究で使用したライブラリー調整試薬は、ショートリードでロングリードと同等の解析を行うものであるが反復配列を含む領域の配列を完全に決定することはできなかった。この原因を特定することは困難であるが、Rj の培養に使用した宿主細胞の核酸の存在が原因で試薬の性能が十分に発揮されなかつた可能性は大きいと考えられた。解読精度の向上のためには Rj の核酸をより高濃度に精製する方法の検討が必要であると考えられた。

TELL-SORT によるマッピング解析の結果を過去 30 年間に日本で分離された 31 株の Rj の配列を調査した既報⁴⁾と比較すると、今回分離された Rj は Lineage3 に分類される OHH-1 と最も近縁であることが判明した。同論文では人の臨床検体から分離された 17 株を含めた 27 株が Lineage1 に分類されており、Lineage3 に分類されたのはマダニから分離された OHH-1 のみであった。今回臨床検体から分離された株が Lineage3 の OHH-1 株と近縁なのは非常に興味深い。この系統の Rj 株が全国に分布しているのか、あるいは、比較的狭い地域

に限局した株であるのかは今の段階では不明である。これらの仮説を検証するために、今後も臨床検体における Rj の遺伝子解析を継続していくとともに、兵庫県内に生息するマダニの調査とそれが保有する Rj の遺伝子解析にも挑戦していきたい。

【参考文献】

1. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*, Nicole C Ammerman, Magda Beier-Sexton, Abdu F Azad PMCID: PMC2725428 NIHMSID: NIHMS129414 PMID: 19016440
2. リケッチャ感染症診断マニュアル 令和元年6月版, 国立感染症研究所
3. Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals. Michael L. Levin, Alyssa N. Snellgrove, Galina E. Zemtsova, PMCID: PMC5661872 NIHMSID: NIHMS914393 PMID: 27282078 DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.05.011
4. Extremely Low Genomic Diversity of *Rickettsia japonica* Distributed in Japan, Arzuba Akter, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Fumio Terasoma, Kouji Kida, Masakatsu Taira, Fumiko Nakadouzono, Mutsuyo Gokuden, Manabu Hirano, Mamoru Miyashiro, Kouichi Inari, Yukie Shimazu, Kenji Tabara, Atsushi Toyoda, Dai Yoshimura, Takehiko Itoh, Tomokazu Kitano, Mitsuhiro P. Sato, Keisuke Katsura, Shakhinur Islam Mondal, Yoshitoshi Ogura, Shuji Ando, Tetsuya Hayashi, Genome Biology and Evolution, Volume 9, Issue 1, January 2017, Pages 124-133, <https://doi.org/10.1093/gbe/evw304>

【経費使途明細】

使 途	金 額
① ゲノム解析関連試薬	244,334 円
② DNA 抽出試薬	29,744 円
③ 細胞培養関連試薬および消耗品	25,058 円
④ 振込手数料	880 円
合 計	300,016 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円