

< 欧文(論文・総説・著書等) >

Single Nucleotide Polymorphisms in *hsp65* and MACPPE12 Genes of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

D. A. Starkova¹, Tomotada Iwamoto², A. A. Vyazovaya¹, V. M. Molchanov³, V. Yu. Zhuravlev⁴, B. I. Vishnevsky⁴, and O. V. Narvskaya^{1,4}

¹St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Kobe Institute of Health, ³St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, ⁴St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology

Russian Journal of Genetics 55: 544-550, 2019

要旨: The aim of our study was to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *hsp65* and MACPPE12 genes to characterize the Russian population of *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) in the context of studying phylogenetic relationships and the evolution of geographically distant populations of *M. avium* subsp. *hominissuis*. The sequence analysis of the *hsp65* and MACPPE12 genes was applied for 40 MAH strains isolated from humans (patients with mycobacteriosis). In total, 40 MAH strains were classified into three different *hsp65* sequevars: code 1, code 2, and code 3. The majority of MAH strains (72.5%) belonged to code 1. The sequence analysis of the MACPPE12 gene revealed seven sequevars at the amino acid level: AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13, and AA_Rus01. A comparative analysis of the SNPs profiles of the *hsp65* and MACPPE12 genes allowed us to identify differences and similarities between geographically distant populations of MAH, which highlighted the variability of the global population of *M. avium* species.

和訳: ロシア人MAC症患者から分離された40株の遺伝的多様性を*hsp65*遺伝子とMACPPE12遺伝子を用いて評価した。全40株は、*hsp65* 遺伝子の塩基配列では多様性は低く、code 1, 2, 3の3つの遺伝型に分類された。一方、MACPPE12遺伝子では、より高い多様性が認められ、7つのアミノ酸タイプ (AA01, AA02, AA04, AA07, AA08, AA13, AA_Rus01) に分類された。ロシア分離株において、最も優占した遺伝型は、*hsp65* code 1、MACPPE12 AA type 02であった。AA_Rus01は新規の遺伝型であり、ロシアに特徴的なMAH株の存在が示された。

Evaluation of Q Gene Mycobacteria: A novel and easy nucleic acid chromatography method for mycobacterial species identification

Kinuyo Chikamatsu¹, Akio Aono¹, Akiko Kawai², Hiroyuki Hata², Tomotada Iwamoto³, Yuriko Igarashi¹, Akiko Takaki¹, Hiroyuki Yamada¹, and Satoshi Mitarai^{1,4}

¹The Research Institute of Tuberculosis, ²Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., ³Kobe Institute of Health, ⁴Nagasaki University

J Microbiol Methods 163:105657. 2019

要旨: A simple, rapid, and new diagnostic test for mycobacteria, named Q Gene Mycobacteria, has been developed. It is based on multiplex PCR using primers harbouring DNA tags combined with a dipstick nucleic acid chromatography method, which does not require the denaturation of PCR products for hybridization and can identify five species of mycobacteria including *M. tuberculosis* complex (MTC), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, and *M. goodii*. A total of 340 mycobacterial strains/isolates were tested, of which 159 were type strains (four MTC and 155 non-tuberculosis mycobacteria (NTM) including four subspecies) and 181 were clinical isolates. Species identification of NTM isolates was performed using the DNA-DNA hybridization method and/or direct sequencing of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB* genes. Q Gene Mycobacteria showed excellent concordance for species identification, specifically 99.4% (158/159) for type strains and 99.4% (180/181) for clinical isolates. The two strains that were misidentified as *M.*

goodii were *M. paratuberculosis*. Q Gene Mycobacteria could be a useful tool for the identification of specific mycobacteria in clinical laboratories.

和訳: マルチプレックスPCRで得たPCR産物をディップスティックで検出することで、臨床上主要な5菌種 (*M. tuberculosis* complex (MTC), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, and *M. goodii*) を検出できるQ gene Mycobacteriaシステムを開発した。核酸クロマトグラフィ法により、迅速簡便に菌種同定ができる。本システムの性能を159菌種の標準株と181株の臨床分離株を用いて評価した。Q Gene systemは*M. goodii*と*M. paratuberculosis*の両菌種を鑑別できなかったが、その他のすべての菌種を正しく鑑別した。臨床診断に有用な検査法であることが確認された。

The recombination-cold region as an epidemiological marker of recombinogenic opportunistic pathogen *Mycobacterium avium*

Hirokazu Yano¹, Haruo Suzuki², Fumito Maruyama³ and Tomotada Iwamoto⁴

¹Tohoku University, ²Keio University, ³Hiroshima University, ⁴Kobe Institute of Health

BMC Genomics 20:752, 2019

要旨: The rapid identification of lineage remains a challenge in the genotyping of clinical isolates of recombinogenic pathogens. The chromosome of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH), an agent of *Mycobacterium avium* complex (MAC) lung disease, is often mosaic and is composed of chromosomal segments originating from different lineages. This makes it difficult to infer the MAH lineage in a simple experimental set-up. To overcome this difficulty, we sought to identify chromosomal marker genes containing lineage-specific alleles by genome data mining. We conducted genetic population structure analysis, phylogenetic analysis, and a survey of historical recombination using data from 125 global MAH isolates. A recombination-cold region of 116 kb contains an insertion hotspot and is flanked by a mammalian cell-entry protein operon where allelic variants have previously been reported to occur. P-450 gene in the recombination-cold region was found as a marker gene that can be used to predict major lineages of *M. avium*. This will facilitate the epidemiological study of MAC, and may also be useful for equivalent studies of other nontuberculous mycobacteria potentially carrying mosaic genomes.

和訳: 我々はいまだに、肺非結核性抗酸菌症の原因菌の一つ *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) のゲノムを集団規模で比較解析し、MAH には少なくとも 5 つの遺伝系統群が存在し、その分布には地域性が認められること、結核菌とは対照的に異種から遺伝子を積極的に獲得していること、さらに、MAH は進化の過程で異系統間での染色体の組み換えを頻繁に行っていることを明らかにした。本研究では、全ゲノムワイドに染色体の組み換え領域を詳細に解析することで、すべての遺伝系統群において組み換えが起こりにくい cold spot 領域の存在を明らかにした。さらに、この領域内に位置する遺伝子の一つが遺伝系統群分類を支持する遺伝マーカーとして利用できることを見出した。

Genetic relatedness of *Mycobacterium avium* subsp.

hominissuis isolates from bathrooms of healthy subjects, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas

Kentaro Arikawa¹, Tomoaki Ichijo², Satomi Nakajima¹, Yukiko Nishiuchi³, Hirokazu Yano⁴, Aki Tamaru⁵, Shiomi Yoshida⁶ Fumito Maruyama⁷, Atsushi Ota^{3,7}, Masao Nasu^{2,8}, Daria A. Starkova⁹, Igor Mokrousov⁹, Olga V. Narvskaya⁹, Tomotada Iwamoto¹

¹Kobe Institute of Health, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Toneyama Institute for Tuberculosis Research, ⁴Graduate School of Life Sciences, Tohoku University ⁵Osaka Institute of Public Health, ⁶Kinki-Chuo Chest Medical Center, ⁷Graduate School of Medicine, Kyoto University, ⁸Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka Ohtani University, ⁹St. Petersburg Pasteur Institute

Infect Genet Evol. 74:103923, 2019

要旨: Japan reportedly has the highest incidence rate of nontuberculous mycobacterial lung disease in the world. In Japan, the most common etiology is *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH). MAH is a typical inhabitant of the environment, especially bathrooms, which are considered as a potential source of infection. To corroborate this hypothesis, we determined the detection rate of MAH in bathrooms of healthy volunteers by an ordinary culture method and we analyzed the genetic relatedness of these isolates with those from patients and other sources. We collected swabs of bathtub inlets, showerheads, bathroom drains, and shower water from 180 residences throughout Japan.

和訳: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) は浴室環境に生息しており、肺 NTM 症の潜在的な感染源と考えられている。この仮説を裏付けるため、培養法で健康なボランティアの浴室からの MAH の検出率を決定し、患者分離株との遺伝的関連性を解析するため、全国 180 戸の浴室環境を調査した。健康ボランティアの浴室から分離された MAH とヒト臨床分離株との遺伝的関連性を調べるために VNTR 解析を行ったところ、健康者浴室由来の MAH 遺伝子型株は、ヒト臨床分離株や、日本人患者の浴室から分離されたもの、ロシアの患者や日本の豚からは認められなかった。本研究では、日本における浴槽給湯口が特に MAH の環境ニッチを提供していることが示された。

Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated From Cooling Towers in Japan

Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto, Shinobu Tanaka, Kentaro Arikawa, Tomotada Iwamoto

Kobe Institute of Health,

Int J Environ Res Public Health 16(9): 1664, 2019

要旨: We investigated the genetic characteristics of 161 *Legionella pneumophila* strains isolated over a period of 10 years from cooling towers in Japan. Minimum spanning tree analysis based on the sequence-based typing (SBT) of them identified three clonal complexes (CCs); CC1 (105/161, 65.2%), CC2 (22 /161, 13.7%), and CC3 (20/161, 12.4%). CC1 was formed by serogroup (SG) 1 and SG7, whereas CC2 was mainly formed by SG1. All of the CC3 isolates except two strains were SG13. The major sequence types (STs) in CC1 and CC2 were ST1 (88/105, 83.8%) and ST154 (15/22, 68.2%), respectively. These STs are known as typical types of *L. pneumophila* SG1 in Japanese cooling tower. Additionally, we identified 15 strains of ST2603 as the major type in CC3. This ST has not been reported in Japanese cooling tower. Whole genome sequencing (WGS) analysis of the representative strains in the three CCs, which were isolated from various cooling towers over the 10 years, elucidated high clonal population of *L. pneumophila* in Japanese cooling tower. Moreover, it revealed that the strains of CC2 are phylogenetically distant compared to those of CC1 and CC3, and belonged to *L. pneumophila* subsp. *fraseri*.

和訳: 冷却塔水から分離された *L.pneumophila* 161 株(2003-2012)を用いて、SBT(sequence based typing)を行った結果、大きく3つのグループ clonal complex(CC)に分類されることを見出した。CCの代表的なSTについては、それぞれCC1はST1、CC2はST154、CC3はST2603であった。CCの代表的株のゲノム系統解析を行った結果、ゲノム系統でも大きく三つにクラスターが分かれ、STのグループを反映した。CC2は他の二つのCCとは大きく離れており、*L.pneumophila* subsp. *fraseri*のゲノムと同一クラスターに存在した。

また、分離年・施設に関わらず近縁であった為、特定の遺伝系統が広く伝播している可能性が示唆された。

Assessment of the Local Clonal Spread of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 12F Caused Invasive Pneumococcal Diseases Among Children and Adults

Noriko Nakanishi¹, Takeshi Yonezawa¹, Shinobu Tanaka¹, Yuki Shirouzu², Yuki Naito², Akemi Ozaki², Natsuki Hama¹, Akihiro Ijichi², Tomotada Iwamoto¹, Ryohei Nomoto¹

¹Kobe Institute of Health, ²Public Health Center of Kobe City

J Infect Public Health 12(6):867-872, 2019

要旨: We conducted active surveillance to elucidate the distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive pneumococcal disease (IPD) and clarified the genetic relatedness among the isolates in Kobe City, Japan. Forty-five IPD-causing *S. pneumoniae* strains were analyzed from March 2016 to May 2018 through active surveillance in Kobe City, Hyogo, Japan. Serotypes were determined by multiplex serotyping PCR and the Quellung reaction with pneumococcal antisera. Fourteen Sp12F strains were subjected to whole-genome sequencing (WGS). Among 45 isolates, the most frequent serotypes were 12F (n=14, 31%), 24F (n=5, 11%), and 10A (n=4, 9%). Multilocus sequence typing (MLST) analysis of 14 isolates of Sp12F divided them into ST4846 (n=4) and ST6495 (n=10). WGS showed clonality of the 10 isolates of ST6495, with only 13 single nucleotide polymorphisms in the genomes. Meanwhile, ST4846 strains in Kobe differed from only the outbreak strains of Sp12F ST4846 in Tsuruoka, Japan, reported on 2018. Serotype monitoring showed Sp12F to be the predominant serotype in Kobe, and WGS revealed the clonal spread of Sp12F ST6495 in this city. Thus, the spread of Sp12F could become a serious public health problem in Japan, warranting thorough monitoring in future.

和訳: 神戸市における侵襲性肺炎球菌感染症(invasive pneumococcal disease; IPD)サーベイランスにおいて、最も多く検出された血清型12F(14株)の遺伝子型(Sequence type; ST)は、ST6945(10株)とST4846(4株)であり、諸外国で高頻度に分離される遺伝子型とは異なっていた。全ゲノムによるSNP系統解析を実施した結果、ST6945の菌株のクローナリティーは高く、同一クローンが伝播していた可能性が示唆された。一方、ST4846はST6945よりも多様性があり、神戸市内においては散発的な発生であることが示唆された。血清型12Fは13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)には含まれない血清型であることから、今後、日本における血清型12Fの動向には注視していく必要がある。

***Vibrio Cholerae* Infection in Japan Not Associated With Overseas Travel**

Masao Tatebe¹, Asako Doi², Seiko Nasu³, Natsuki Hama⁴, Ryohei Nomoto⁴, Eiji Arakawa⁵, Hidemasa Izumiya⁵, Hiroaki Nishioka²

¹Department of Emergency, Kobe City Medical Center General Hospital, Japan. ²Department of Infectious Diseases, Kobe City Medical Center General Hospital, Japan. ³Department of Laboratory Medicine, Kobe City Medical Center General Hospital, Japan. ⁴Kobe Institute of Health, Kobe, Japan. ⁵National Institute of Infectious Diseases, Japan.

Intern Med. 58:2581-2583. 2019

要旨： A 74-year-old Japanese man who was taking antacids presented with profuse diarrhea. Stool culture revealed *Vibrio cholerae* O1 strain, serogroup Ogawa, biotype El tor. He recalled he had consumed some sashimi but denied any history of travelling abroad, and another cholera case with almost the same strain was reported at the same time in a remote prefecture in the Kanto area. This is a rare case of travel-unrelated cholera in Japan, and it illustrates the importance of suspecting cholera in all patients presenting with large volumes of watery diarrhea in Japan, especially in those who are taking antacids, regardless of their international travel history.

和訳：感染性胃腸炎を罹患した海外渡航歴のない74歳男性の検便から *Vibrio cholera* が分離された。分離株は血清型 O1・小川型で生物型は El tor であり *ctx* 遺伝子が確認された。遺伝型を決定したところ、関東で分離されたコレラ菌株と同一の遺伝型であったが両者の関係性はなく、感染経路も不明であった。

Development of a specific cytolethal distending toxin (cdt) gene (Eacdt)-based PCR assay for the detection of *Escherichia albertii*

Atsushi Hinenoya¹, Hidetoshi Ichimura¹, Noritomo Yasuda¹, Seiya Harada², Kazuhiro Yamada³, Masahiro Suzuki³, Yoshio Iijima⁴, Akira Nagita⁵, M John Albert⁶, Noritoshi Hatanaka³, Sharda Prasad Awasthi³, Shinji Yamasaki⁹

¹Osaka Prefecture University, ²Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ³Aichi Prefectural Institute of Public Health, ⁴Kobe Institute of Health, ⁵Mizushima General Hospital, ⁶Kuwait University

Diagnos Microbiol Infect Dis 95: 119-124, 2019

要旨： Many *Escherichia albertii* isolates, an emerging pathogen of human and birds, might have been misidentified due to the difficulty of differentiating this bacterium from *Escherichia coli* and *Shigella* spp. by routine biochemical tests, resulting in under-estimation of *E. albertii* infections. We have developed a polymerase chain reaction (PCR) assay that targets *E. albertii* cytolethal distending toxin (*Eacdt*) genes, which include the genes previously identified as *Escherichia coli* cdt-II. This assay could generate a single 449-bp PCR product in each of 67 confirmed *E. albertii* strains but failed to produce PCR product from any of the tested non-*E. albertii* enteric strains belonging to 37 different species, indicating 100% sensitivity and specificity of the PCR assay. The detection limit was 10 CFU per PCR tube and could detect 10⁵ CFU *E. albertii* per gram of spiked healthy human stool. The *Eacdt* gene-based PCR could be useful for simple, rapid, and accurate detection and identification of *E. albertii*.

和訳：ヒトや鳥にとって新種の病原細菌であるエシエリキア・アルバーティは、通常の生化学的検査では大腸菌や赤痢菌と誤同定されることがある。その結果、エシエリキア・アルバーティは過小評価されている。著者らはエシエリキア・アルバーティの細胞膨化致死因子 (*Eacdt*) 遺伝子をターゲットとする PCR を開発した。この PCR は、感度と特異性が 100% であり、簡便で迅速で正確なエシエリキア・アルバーティの検出方法として有用である。

<邦文(論文・総説・著書等)>

研究所紹介シリーズ 神戸市環境保健研究所感染症部.

飯島義雄

神戸市環境保健研究所

臨床とウイルス 47: 174-177、2019

要旨:神戸市環境保健研究所は、1900年に東山避病院(後の神戸市立東山病院)が常設病院となった際に設けられた細菌検査室とみることができる。100年以上の歴史を有しており、1981年に現在の地に新築移転してきた。

神戸市内で、さまざまな感染症事例が発生し、保健所と連携して、それらの事例に対応してきた。1987年には日本人初のエイズ患者発生、2000年には成人施設でのロタウイルスの集団感染、2005年には鳥類展示施設でのオウム病の集団発生、2009年には国内初の新型インフルエンザの発生など、さまざまな健康危機事例があった。これらの中には、マスコミでも大きく取りあげられた事例も少なくない。

今後も試験検査、調査研究を通じて、神戸市民152万人の安全・安心に貢献していく組織でありたいと考える。

STQ法を用いたGC-MS/MSによる農産物中残留農薬分析法の検証

大久保祥嗣^{1,2} 八木正博¹

¹神戸市環境保健研究所、²現所属 神戸市保健所西衛生監視事務所

食品衛生学雑誌 61: 47-52、2020

要旨:ポリマーベース固相ミニカラムを使用するSTQ法による前処理で得られた試験溶液を、胃袋型をしたスパイラルインサート・大量注入口装置搭載GC-MS/MSにより測定した場合、農薬329成分について、良好な感度、直線性の良好な検量線が得られ、定量下限値10 ng/mLとする測定に必要なS/Nが確認された。食品中に含まれる農薬のGC-MS/MSによる測定で広く知られている食品マトリックスの影響は、STQ法においても確認され、6食品のマトリックス添加標準溶液(5 ng/mL)の定量値が本来の濃度の110%を超える農薬成分も多数みられることから、より正確な定量にはPEG溶液添加による補正のみによらず、食品ごとのマトリックス添加標準溶液により作成した検量線での定量が望ましいと考えられる。今回、検証した分析法は使用する器具が小さく、精製効果に優れており、通知試験法に比べて溶媒の使用量が少なく、また、溶媒濃縮を行わないため操作も簡便であった。

