

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590875

研究課題名（和文） 呼吸器細菌感染症におけるリボゾーム RNA を利用した早期診断法・病勢評価法の開発

研究課題名（英文） Development of early diagnosis and disease stage evaluation method using ribosomal RNA gene in respiratory bacterial infectious diseases

研究代表者

星野 仁彦 (HOSHINO YOSHIHIKO)

国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 感染制御部 室長

研究者番号：20569694

研究成果の概要（和文）：呼吸器細菌感染症の早期診断と病勢評価を目的として、呼吸器疾患患者由来の喀痰を利用した迅速診断法を開発した。本研究では特に呼吸器抗酸菌感染症に注目して臨床検体を使用して、16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子を標的とした早期診断法を開発した。加えて 16S rRNA のみで鑑別ができない菌については internal transcribed spacer (ITS), heat shock protein 65 (hsp65), RNA polymerase beta subunit (rpoB) 遺伝子解析を追加した。抗酸菌においては 16S rRNA の相同性が高く他の遺伝子を組み合わせることで鑑別診断を実行する必要性が認められた。

研究成果の概要（英文）：We developed rapid diagnosis and disease stage evaluation method for pulmonary bacterial infection. Especially we focused pulmonary mycobacterial infection in this study. Principally, 16S ribosomal RNA (rRNA) gene was targeted and other genes such as internal transcribed spacer (ITS), heat shock protein 65 (hsp65), and RNA polymerase beta subunit (rpoB) were adjunctively utilized. We noticed the similarity of 16S rRNA genes among mycobacteria species and the necessity of combination of other genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
2012年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

呼吸器細菌感染症特に抗酸菌感染症の診断は細菌の培養が基本であるが、抗酸菌は発育に多大な時間を要するため診断の遅れが問題となっていた。また近年ヒトに対して病原性のある環境抗酸菌の存在が明らかとなり、

これらの迅速なる鑑別法が要望されていた。

2. 研究の目的

呼吸器抗酸菌感染症の早期診断と病勢評価と目的として、患者由来の喀痰を利用して細菌中の ribosomal RNA (rRNA)、特に 16S

rRNA 遺伝子を増幅し、核酸配列を解読することで呼吸器抗酸菌感染症早期診断と病勢評価を行う。

3. 研究の方法

本研究全体について国立感染症研究所医学研究倫理審査を「呼吸器感染症の早期診断および病勢評価に関する研究」として申請し、承認されている。患者由来の喀痰より核酸を抽出しPCR法で菌由来 16S rRNA 遺伝子をターゲットとして増幅し、増幅した核酸断片をサンガー法によって解読した。16S rRNA 遺伝子の解析のみで鑑別が確定しないものは ITS, hsp65, rpoB 遺伝子を標的として増幅し、同様にサンガー法を使用して核酸を解読した。加えてそれぞれの結果を phylogenetic tree を作成することで比較解析した。

4. 研究成果

抗酸菌は他の一般細菌とは異なり菌種間で 16S rRNA 遺伝子の相同性が高かった。現在 taxonomical に異なった菌と分類されているものも約 90%の類似性が存在した。よって 16S rRNA 遺伝子のみで呼吸器抗酸菌感染症の鑑別診断を行うことは誤謬を誘導する可能性が示唆された。そこで適宜 ITS, hsp65, rpoB 遺伝子の情報を併用して呼吸器抗酸菌の鑑別を行う必要性が認められた。これらの遺伝子の併用で呼吸器抗酸菌の鑑別診断が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Nakanaga K, Yotsu RR, Hoshino Y, Suzuki K, Makino M, Ishii N. Buruli ulcer and mycolactone producing mycobacteria. Japan Journal of Infectious Diseases Japan Journal of Infectious Diseases 査読有 2013; 66:83-88.
- ② Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu RR, Makino M, Ishii N. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. Journal of Dermatology 査読有 2013; 40:151-159.
- ③ Hamamoto T, Yuki A, Naoi K, Kawakami S, Banba Y, Yamamura T, Hikota R, Watanabe J, Kimura F, Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N, Shimazaki H, Nakanishi K, Tamai S. Bacteremia due to *Mycobacterium massiliense* in a patient with chronic myelogenous leukemia: case report. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 査読有 2012 Oct;74(2):183-5.
- ④ Kamijo F, Uhara H, Kubo H, Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N, Okuyama R. A Case of Mycobacterial Skin Disease Caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a Review of Cutaneous Infection. Case Reports in Dermatology. 査読有 2012 Jan;4(1):76-9
- ⑤ Yotsu RR, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii N. Buruli Ulcer and Current Situation in Japan: a new emerging cutaneous *Mycobacterium* infection. The Journal of Dermatology 査読有 2012 Jul;39(7):587-93
- ⑥ Onoe H, Nakanaga K, Yotsu R, Hoshino Y, Ishii N, Takeuchi T. Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient. The Journal of Dermatology 査読有 2012 Oct;39(10):869-70
- ⑦ Nakanaga K, Hoshino Y, Hattori Y, Yamamoto A, Wada S, Hatai K, Makino M, Ishii N. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. Journal of Veterinary Medical Science 査読有 74:275-278, 2012
- ⑧ Nakanaga K, Hoshino Y, Wakabayashi M, Fujimoto N, Tortoli E, Makino M, Tanaka T, Ishii N. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. The Journal of Dermatology 査読有 2012 Apr;39(4):389-96
- ⑨ 竹村佳純、上田幹雄、中西雅樹、小森敏明、藤田直久、中永和枝、星野仁彦、石井則久、岩崎吉伸：浸潤性胸腺腫・重症筋無力症治療中に発症した *Mycobacterium massiliense* による播種性非結核性抗酸菌症の一例 呼吸 査読有 31(11) 1070-1076 2012
- ⑩ 今長慶志、星野洋良、藤本典宏、小林孝志、多島新吾、中永和枝、星野仁彦、石井則久： *Mycobacterium massiliense* 皮膚感染症の 1 例。皮膚臨床 査読有 54: 1207-1211, 2012.
- ⑪ Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu RR, Makino M, Ishii N. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed during

- 1980-2010 in Japan. Journal of Clinical Microbiology 査読有 49:3829-3836,2011
- ⑫ Otsuki T, Izaki S, Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N, and Osamura K. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection: a sporadic case in Japan. The Journal of Dermatology 査読有 2012 Jun;39(6):569-72
- ⑬ Nakanaga K, Hoshino Y, Era Y, Matsumoto K, Kanazawa Y, Tomita A, Furuta M, Washizu M, Makino M, Ishii N. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. Journal of Clinical Microbiology. 査読有 2011 Feb;49(2):613-7.
- ⑭ 湊はる香、若狭朋子、松村由美、中永和枝、星野仁彦、石井則久：多剤併用療法が奏効したブルーリ潰瘍（*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症）の一例 皮膚科の臨床 査読有 53:1301-1304, 1219-1220,2011.

〔学会発表〕（計 19 件）

- ① 榊原ゆみ、中永和枝、森本耕三、佐々木結花、倉島篤行、永井英明、藤原宏、長谷川直樹、松本智成、稲瀬直彦、牧野正彦、石井則久、星野仁彦 *Mycobacterium abscessus* と *Mycobacterium massiliense* の multiple PCR 法による迅速鑑別の検討（ミニシンポジウム）第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京国際フォーラム 東京）2013 年 4 月
- ② 星野仁彦、深野華子、中永和枝、森本耕三、矢野量三、尾形英雄、工藤翔二、倉島篤行 迅速発育菌 *M. abscessus*, *M.massiliense* の薬剤感受性 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京国際フォーラム 東京）2013 年 4 月
- ③ 榊原ゆみ、稲瀬直彦、星野仁彦 *Mycobacterium avium* complex 感染における宿主マクロファージ inducible C-type lectin (mincle) を介した自然免疫応答の解析（ミニシンポジウム）第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京国際フォーラム 東京）2013 年 4 月
- ④ 星野仁彦、甲斐雅規、中田登、関塚剛史、竹内史比古、牧野正彦、石井則久、黒田誠 *Mycobacterium abscessus* group の比較ゲノム解析（ミニシンポジウム）第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京国際フォーラム 東京）2013 年 4 月
- ⑤ 森本耕三、榊原ゆみ、星野仁彦、吉山崇、久世眞之、奥村昌夫、佐々木結花、吉森浩三、尾形英雄、工藤翔二、倉島篤行 肺 MAC 症におけるバイオマーカー（抗

- GPL-IgA 抗体、好中球上 CD64 抗原、活性化ビタミン D, Cathelicidin:LL-37) の有用性についての検討 第 88 回日本結核病学会総会（幕張メッセ国際会議場 千葉）2013 年 3 月
- ⑥ 星野仁彦、中永和枝、鹿住祐子、前田伸司、石井則久 *Mycobacterium massiliense* の完全長ゲノム解析と *M. abscessus* group 間の比較解析 第 88 回日本結核病学会総会（幕張メッセ国際会議場 千葉）2013 年 3 月
- ⑦ 榊原ゆみ、森本耕三、吉山崇、倉島篤行、藤原永年、稲瀬直彦、石井則久、星野仁彦 抗酸菌感染症における macrophage inducible C-type lectin (mincle) の発現 第 88 回日本結核病学会総会（幕張メッセ国際会議場 千葉）2013 年 3 月
- ⑧ Y Hoshino. Receptor of trehalose di-mycolate (TDM), mincle (macrophage inducible c-type lectin) determined the susceptibility of *mycobacterium tuberculosis*. EMBO conference "Tuberculosis 2012: biology, pathogenesis, intervention strategies". Institut Pasteur (Paris France) September 11-15 2012
- ⑨ 星野仁彦、深野華子、中永和枝、森本耕三、鹿住祐子、前田伸司、和田新平、奥村昌夫、吉山崇、尾形英雄、工藤翔二、倉島篤行 単一病院での過去 25 年間の肺 MAC 症における菌側因子の変遷について 第 87 回日本結核病学会総会（広島国際会議場 広島）2012 年 5 月
- ⑩ 森本耕三、星野仁彦、前田伸司、吉山崇、尾形英雄、倉島篤行、工藤翔二 肺 MAC 症の菌側因子の解析 第 87 回日本結核病学会総会（広島国際会議場 広島）2012 年 5 月
- ⑪ 星野仁彦、深野華子、中永和枝、森本耕三、吉山崇、尾形英雄、工藤翔二、和田新平、倉島篤行 MAC 菌感染症に対する ex vivo 薬剤感受性試験 第 87 回日本結核病学会総会（広島国際会議場 広島）2012 年 5 月
- ⑫ 森本耕三、星野仁彦、吉山崇、吉森浩三、奥村昌夫、尾形英雄、工藤翔二、倉島篤行 肺 MAC 症における抗 GPL 抗体、好中球上 CD64 抗原および血中 TREM-1 と定量的画像分析による画像スコアとの関連についての検討 第 87 回日本結核病学会総会（広島国際会議場 広島）2012 年 5 月
- ⑬ 和田新平、深野華子、中永和枝、星野仁彦 ヒト非結核性抗酸菌症の起原菌と類似した抗酸菌による水棲動物の疾患 第 87 回日本結核病学会総会（広島国際会議場 広島）2012 年 5 月

- ⑭ 深野華子、中永和枝、星野仁彦、石井則久、和田新平 迅速発育抗酸菌による皮膚疾患 2 症例と海洋生物から分離された迅速発育抗酸菌の比較検討 第 87 回日本結核病学会総会 (広島国際会議場 広島) 2012 年 5 月
- ⑮ 中永和枝、星野仁彦、石井則久 本邦の “*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” を起因菌とするブルーリ潰瘍症例の増加 第 87 回日本結核病学会総会 (広島国際会議場 広島) 2012 年 5 月
- ⑯ 星野仁彦、深野華子、中永和枝、和田新平、石井則久 迅速発育菌 *M. abscessus* と *M. massiliense* の薬剤感受性について 第 87 回日本結核病学会総会 (広島国際会議場 広島) 2012 年 5 月
- ⑰ 中永和枝、星野仁彦、石井則久 マルチプレックス PCR 法を用いた *M. massiliense* と *M. abscessus* 鑑別診断法の開発 第 87 回日本結核病学会総会 (広島国際会議場 広島) 2012 年 5 月
- ⑱ 星野仁彦、中永和枝、鹿住祐子、前田伸司、石井則久 *M. massiliense* の全ゲノムシーケンス 第 87 回日本結核病学会総会 (広島国際会議場 広島) 2012 年 5 月
- ⑲ K Nakanaga, Y Hoshino, M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed during 1980-2010 in Japan. at US-JAPAN cooperative medical science program 46th tuberculosis and leprosy research conference (OMIYA, JAPAN) December 2011

[図書] (計 2 件)

- ① 星野仁彦 病態のしくみがわかる免疫学 関修司、安保徹編集 医学書院 2010 III. 疾患や病態にかかわる免疫(臨床と免疫) 8. 肺疾患 e. AIDS 合併結核の分子生物学的機序 頁 180-181
- ② 星野仁彦 肺 MAC 症診療 Up to Date 倉島篤行 小川賢二編集 南江堂 2013 各論 I-4 肺 MAC 症とサイトカイン 頁 122-127

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 仁彦 (HOSHINO YOSHIHIKO)
国立感染症研究所 ハンセン病研究センター感染制御部 室長
研究者番号：20569694

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

後藤 元 (GOTO HAJIME)
杏林大学 医学部 医学部長
研究者番号：80134617

工藤 翔二 (KUDOH SHOJI)
日本医科大学 医学部 名誉教授
研究者番号：40256912