

< 欧文(論文・総説・著書等) >

Two new cases of pulmonary infection by *Mycobacterium shigaense*, Japan

Shiomi Yoshida¹, Tomotada Iwamoto², Takehiko Kobayashi¹, Ryohei Nomoto², Yoshikazu Inoue¹, Kazunari Tsuyuguchi¹, and Katsuhiko Suzuki¹

¹National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ²Kobe Institute of Health

Emerg Infect Dis. 26:2728-2732, 2020

(SY, TI, TK contributed equally)

要旨: An increase in incidence of pulmonary NTM infections among immunocompetent patients in recent years is an emerging public health concern. We report 2 case-patients in Japan with *Mycobacterium shigaense* pulmonary infections. One patient was given aggressive treatment and the other conservative treatment, according to distinctive radiologic evidence. A close phylogenetic relationship based on whole-genome sequencing was found between strain from the conservatively treated patient and a reference strain of cutaneous origin. In summary, we found that the NB-type *M. shigaense* pulmonary strain was closely related to the cutaneous reference strain, but the more pathogenic FC-type strain differed considerably. Our results for this rare species open possibilities for further investigation into this neglected NTM disease and provide indications for the need for therapy.

和訳: 皮膚疾患を引き起こす非結核性抗酸菌の*M. shigaense*による肺感染症2例を経験した。2例のうち1例は結節性気管支拡張症(NBタイプ)を呈しており、もう1例は繊維空洞型(FCタイプ)を呈した。皮膚疾患の原因菌として知られる*M. shigaense*が*M. avium*によって引き起こされる肺MAC症で典型的に認められる二つの病型、すなわち、NBタイプとFCタイプを引き起こした症例を世界で初めて報告した。さらに我々は今回の症例で分離された菌の全ゲノム解析を行い、過去に皮膚疾患を引き起こした*M. shigaense*のゲノム情報との比較を行った。その結果、NBタイプの患者由来株は皮膚疾患患者由来株と全ゲノム中わずかに19カ所しか塩基変異が認められなかったのに対し、空洞を伴い12か月に及ぶ多剤併用化学療法を要したFCタイプ由来株は約7000カ所の変異が認められ、病原性の上昇が示唆された。

Bacterial population kinetics in heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* harbouring rare resistance-conferring mutations in *gyrA* and *rpoB* imply an epistatic interaction of mutations in a pre-XDR-TB patient

Shiomi Yoshida¹, Tomotada Iwamoto², Kentaro Arikawa², Tsuyoshi Sekizuka³, Makoto Kuroda³, Yoshikazu Inoue¹, Satoshi Mitarai⁴, Taisuke Tsuji⁵, Kazunari Tsuyuguchi¹, and Katsuhiko Suzuki¹

¹National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ²Kobe Institute of Health, ³National Institute of Infectious Diseases, ⁴Research Institute of Tuberculosis, ⁵Red Cross Kyoto Daiichi Hospital

J Antimicrob Chemother 75:1722-1725, 2020

(SY and TI contributed equally. TI, Corresponding author)

要旨: Bacterial population kinetics of strains harbouring drug resistance-conferring mutations within a patient often show cryptic resistance in clinical practice. We report a case that showed emergence and dominance of *Mycobacterium tuberculosis* with uncommon *rpoB* and *gyrA* mutations, followed by an *rpoC* compensatory mutation, during treatment. The subclone in this study possessed rare mutations conferring resistance to rifampicin (*rpoB* V170F) and levofloxacin (*gyrA* S91P) and it rapidly outcompeted other subclones during treatment that included levofloxacin but not rifampicin (<7 days). The high-probability compensatory mutation *rpoC* V483A also emerged and became dominant subsequent to the *rpoB* V170F mutation. To the best of our knowledge, this is the first case showing the emergence of such a rare variant that dominated the population within a patient during treatment of TB.

和訳: 薬剤耐性結核により、結核対策は複雑化している。我々は、結核菌の薬剤耐性化が無作為な遺伝子突然変異の集積によるとする「選択仮説」に対して、特定の変異が次に起る変異の方向性に影響するという「選択的誘導仮説」を唱えている。本論文では、ゲノムディープシーケンスにより1群体のポピュレーション変動解析を行うことで、リファンピシン耐性に関与する*rpoB* V170Fとフルオロキノロン耐性に関与する*gyrA* S91P、さらにcompensatory mutationとして知られる*rpoC*変異の体内動態を詳細に解析した。相乗的エピスタシスを実臨床で示唆する貴重な症例である。

Higher genome mutation rates of Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* during human infection

Mariko Hakamata¹, Hatayo Takihata¹, Tomotada Iwamoto², Aki Tamaru³, Atsushi Hashimoto⁴, Takahiro Tanaka⁴, Shaban A Kaboso¹, Gebremichal Gebretsadik¹, Aleksandr Ilinov¹, Akira Yokoyama¹, Yuriko Ozaki¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Hiroshi Moro⁵, Toshiaki Kikuchi⁴, Shujiro Okuda¹, and Sohkiichi Matsumoto¹

¹Niigata School of Medicine, ²Kobe institute of Health, ³Osaka Prefectural Institute of Public Health, ⁴Niigata University Medical and Dental Hospital, ⁵Niigata Graduate School of Medical and Dental Sciences

Sci Rep 10:17997, 2020

要旨 : We tracked and obtained an original *Mtb* isolate of Beijing lineage from the 1999 tuberculosis outbreak in Japan, as well as five other isolates that spread in humans, and two isolates from the patient caused recurrence. Three isolates were from patients who developed TB within one year after infection (rapid-progressor, RP), and the other three isolates were from those who developed TB more than one year after infection (slow-progressor, SP). We sequenced genomes of these isolates and analyzed the propensity and rate of genomic mutations. Generation time versus mutation rate curves were significantly higher for RP. The ratio of oxidative versus nonoxidation damages induced mutations was higher in SP than RP, suggesting that persistent *Mtb* are exposed to oxidative stress in the latent state. Our data thus demonstrates that higher mutation rates of *Mtb* Beijing strains during human infection is likely to account for the higher adaptability and an emergence ratio of drug resistance.

和訳 : 結核菌北京株の突然変異率は、Lineage 4 に属する結核菌よりも高く、結核菌北京株の高い病原性や薬剤耐性の要因である可能性が示唆された。遺伝子多型解析では、酸化的損傷に起因すると推定されている突然変異が長期潜伏後発症群の方に多く、潜伏期間中にも薬剤耐性変異が起こる可能性が示唆された。結核菌北京株の高頻度の薬剤耐性化を防ぐためには、感染した結核菌の系統により治療法を検討する必要性も考えられた。今後、結核菌系統の特性を理解し、治療法を工夫することで結核の薬剤耐性化や重篤化を防ぐ有効な対策の構築につながることを期待される。

The Novel Coronavirus Pandemic and the State of the Epidemic in Kobe, Japan.

Noriko Nakanishi, Yoshio Iijima

Kobe Institute of Health,

J Disaster Res 16:84-87. 2021

要旨 : The outbreak of the novel coronavirus disease (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, occurred in Wuhan, China in December 2019 and quickly spread to both the developed and developing countries. The virus will continue to infect humans and animals symptomatically or asymptotically, and humans will be expected to coexist with SARS-CoV-2 by preventing infections and its spread. In this paper, we report on the occurrence of the COVID-19 epidemic in Japan, including the city of Kobe.

和訳 : 2019年12月で武漢に端を発した新型コロナウイルス(COVID-19)は、過去のどのパンデミックより急速に世界中に広がった。世界中に広がったこのウイルスは、ヒトや動物に感染し続けるので、感染防御対策をとって、このウイルスと共存していくことが求められるであろう。神戸を含む日本での流行状況について概説した。

A Genome Epidemiological Study of SARS-CoV-2 Introduction into Japan

Tsuyoshi Sekizuka¹, (略: 12名), Ryohei Nomoto⁹, (略: 11名)

¹Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, ⁹Department of Infectious Diseases, Kobe Institute of Health, Kobe, Hyogo, Japan.

mSphere. 2020 Nov;5(6) . doi:10.1128/msphere.00786-20.

要旨: This study aimed to evaluate the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) genome sequences from COVID-19 cases and to characterize their genealogical networks to demonstrate possible routes of spread in Japan. We found that there were at least two distinct SARS-CoV-2 introductions into Japan, initially from China and subsequently from other countries, including Europe. Our findings can help understand how SARS-CoV-2 entered Japan and contribute to increased knowledge of SARS-CoV-2 in Asia and its association with implemented stay-at-home / shelter-in-place / self-restraint / lockdown measures. This study suggested that it is necessary to formulate a more efficient containment strategy using real-time genome surveillance to support epidemiological field investigations in order to highlight potential infection linkages and mitigate the next wave of COVID-19 in Japan.

和訳: 本研究はCOVID-19症例から得られたSARS-CoV-2のゲノムネットワーク解析により、日本での感染伝播様式を明らかにすることを目的とした。その結果、日本へのSARS-CoV-2の侵入は、当初は中国から、その後はヨーロッパを含む他国からと、少なくとも2回に分けて行われたことが判明した。今回の結果は、SARS-CoV-2の日本への侵入経路の解明に役立つとともに、アジアにおけるSARS-CoV-2の流行状況や、自粛要請政策との関連性についての知見の蓄積にも貢献するものである。本研究では、潜在的な感染の関連性を明らかにし、日本におけるCOVID-19の次の波を軽減するためには、疫学的な実地調査を支援するために、リアルタイムのゲノムサーベイランスを用いたより効率的な封じ込め戦略を策定する必要があることが示唆された。

Agglutination of Human Polyomaviruses by Using a Tetravalent Glycocluster as a Cross-Linker

Makoto Ogata¹, Takashi Onoda², Ami Koizumi², Yuhei Tokunaga³, Isao Ohta³, Souichi Nukuzuma⁴, Enoch Y. Park⁵, Taichi Usui⁵, and Tetsuro Suzuki³

¹Fukushima University, ²Fukushima College, ³Hamamatsu University School of Medicine, ⁴Kobe Institute of Health,

⁵Shizuoka University

ACS Omega 5:21940-21947, 2020

要旨: Two kinds of tetravalent double-head sialo-glycosides with short/long spacers between the Neu5Aca2, 6Galβ1, 4GlcNAc units and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) scaffold were found to be capable of binding to virus-like particles of Merkel cell polyomavirus (MCPyV-LP). The assay also showed the effective capture of particles of pathogenic, infectious human polyomavirus JCPyV when complexed with a ligand, suggesting its possible application as a method for trapping viruses by filtration under conditions of virus aggregation. These results show that the tetravalent glycocluster serves as a ligand not only for agglutinating MCPyV-LP but also for trapping the pathogenic virus.

和訳: ウイルスの糖鎖構造 Neu5Aca2, 6Galβ1, 4GlcNAc とエチレングリコール四酢酸(EGTA)の足場の中に存在する短/長スペーサーを有する 2 種類の四価糖鎖クラスターは、メルケル皮膚癌の原因ウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルスの中空粒子(MCPyV-LP)のウイルス様粒子に結合できることが判明した。さらに、進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスであるJC ポリオーマウイルスについても、ウイルスとリガンドの結合し凝集する条件下でフィルターろ過によりトラップできることが明らかになった。以上のことから、四価糖鎖クラスターは架橋剤としてMCPyV-LPを凝集できるだけでなく、JC ウイルスなどのポリオーマウイルスをトラップできたことから、生体からのウイルス除去の臨床応用が可能である。

Characterization of JC polyomavirus derived from COS-IMRb cells

Souichi Nukuzuma¹, Chiyoko Nukuzuma², Masanori Kameoka³, Shigeki Sugiura⁴, Kazuo Nakamichi⁵, Takafumi Tasaki⁶, Koushi Hidaka⁷ and Tsutomu Takegami⁶

¹Kobe Institute of Health, ²Thermocell, ³Kobe University, ⁴Nara Medical University, ⁵National Institute of Infectious Disease, ⁶Kanazawa Medical University, ⁷Kobe Gakuin University

Jpn J Infect Dis 74:48-53, 2021

要旨: JCPyV causes PML, a demyelinating disease of the central nervous system affecting immunocompromised patients. The study of PML-type JCPyV *in vitro* has been limited owing to the inefficient propagation of the virus in cultured cells. In this study, we carried out long-term culture of COS-7 (designated as COS-IMRb cells) transfected with PML-type M1-IMRb, an adapted viral DNA with a rearranged non-coding control region (NCCR). COS-IMRb cells produced high amounts of virus in COS-IMRb cells. The JCPyV genomic DNA derived from a clone of COS-IMRb-3 cells was detected using Southern blotting, as a single band of approximately 5.1 kbp without deletion. These findings suggest the potential of using COS-IMRb-3 cells as a useful tool for screening anti-JCPyV drugs.

和訳: 進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ポリオーマウイルス(JCPyV)がオリゴデンドロサイトに感染することで脳に脱髄を引き起こす致死的な疾患である。JCPyV を宿主域が狭く、培養細胞で効率的に増殖させるのが困難なため研究が滞っていた。本研究は JCPyV の培養細胞での効率的な増殖系を確立するために、COS-7 細胞に IMR-32 細胞で良好に増殖する PML 型 JCPyV である M1-IMRb 細胞由来の PML 型 JCPyV をトランスフェクトして blind passage したところ、高力価のウイルスを産生していることを確認できた。さらに、サザンプロットでウイルスゲノムの検出では欠失はなかった。COS-IMRb-3 細胞は抗 JCPyV 薬のスクリーニング系として有用である。

Human iPS cell-derived astrocytes support efficient replication of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC polyomavirus

Emiko Shinbo¹, Souichi Nukuzuma², Yoh-ichi Tagawa¹

¹Tokyo Institute of Technology, ²Kobe Institute of Health Biochem Biophys Res Comm 533:983-987, 2020

要旨: JCPyV causes PML, a demyelinating disease of the central nervous system, in immunocompromised patients. The study of JCPyV *in vitro* has been limited due to the difficulty of efficiently propagating the virus in cultured cells. In this study, human iPS cell-derived astrocytes were exposed to PML-type JCPyV. Infection, replication, and VP1 and T antigens of JCPyV were detected and confirmed in this culture. PML-type JCPyV genomic DNA in the infected cells was detected as a single band with no deletions. In addition, the non-coding control region (NCCR) of M1-IMRb was conserved in infected cells without point mutations. These findings indicated that a culture system using human iPS cell-derived astrocytes would be useful for studies of PML, especially for screening anti-JCPyV drugs.

和訳: JC ポリオーマウイルス(JCPyV)は進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスで免疫低下の患者に発生する。JCPyV を培養細胞で効率的に増殖させるのが困難なため研究が制限されていた。本研究はヒト iPS 細胞由来のアストロサイトに持続感染細胞である COS-IMRb 細胞由来の PML 型 JCPyV を感染させたところ、良好なウイルス DNA 複製がみられ、ウイルス抗原である VP1 と T 抗原も感染細胞内で検出された。さらに、ウイルスゲノムの検出では欠失はなく、ウイルスの調節領域の塩基配列は親株である調節領域と完全に保持していた。これらの所見からヒト iPS 細胞由来のアストロサイトは PML の研究、特に抗 JCPyV 薬のスクリーニングで有用である。

〈邦文(論文・総説・著書等)〉

3層固相ミニカラムを用いた GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析法の検討

大久保祥嗣^{1,2} 向井健悟¹

¹神戸市環境保健研究所、²現所属 神戸市保健所西部衛生監視事務所

食品衛生学雑誌 61: 239-246、2020

要旨：農産物に含まれる農薬の多成分簡易迅速試験法の検討を行った。本研究では、精製工程の簡素化および使用する溶媒の量と種類を少なくすることを試みた。

試験溶液は農作物の QuEChERS 法による抽出液を、3層(C18、SAX、PSA)の固相を積層したミニカラムにより精製して調製し、この試験溶液を大量注入装置・胃袋型ガラスインサート搭載 GC-MS/MS により分析した。

この試験法により、8 種類の農産物を用いて添加回収試験を実施したところ、241～331 成分が、真度 70%～120%、併行精度 25%未満の目標基準に適合した。

セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS による農産物中残留農薬分析の検証

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 神戸市保健所西部衛生監視事務所

食品衛生学雑誌 62: 14-19、2021

要旨：農産物に含まれる農薬の分析を、セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS により行うことについて検証を行った。セルフクリーニングイオン源は、測定終了後または測定中常時、イオン源内に水素を一定圧で注入することにより、イオン源の汚染を防ぐ機能を有したイオン源である。セルフクリーニングイオン源搭載 GC-MS/MS により、農産物中の農薬分析を行ったところ、明瞭なイオン源の汚染防止効果がみられた。251 種類の農薬成分において良好なピーク感度が得られ、253 成分について決定係数(R^2)0.990 以上の検量線が得られた。6 作物による添加回収試験では 180～221 成分が、真度 70%～120%、併行精度 25%未満の目標基準に適合した。

