

EIAとウイルス抗原捕獲EIAが樹立できたことから、これらのEIA法を用い、骨髄移植後の出血性膀胱炎患者の診断を試みた。はじめに、膀胱炎発症時および60日後の患者血清中のIgMとIgGを測定したところ、いずれの抗体においても有意な上昇がみられた。一方、発症時の尿から抗原検出EIAでBKV抗原の検出を試みたところ陽性となった。また、この尿検体からはPCRでBKV DNAも検出された。これらの結果から、BKVが骨髄移植後の出血性膀胱炎の発症に関与する可能性が示唆された。

D. 考察

組換えバキュロウイルス発現系を用いて、ウイルス構造蛋白を発現しウイルス様粒子(VLPs)を産生する実験は以前からいろいろな動物ウイルスで試されてきた。この発現系によって産生したVLPsはネイティブなウイルス粒子と同じあるいは非常に似た抗原性と免疫原性を有する事が知られている。本研究では、BKVの主要な構造蛋白のVP1を効率よく昆虫細胞Tn5で発現した。BKVP1はマイナーの構造蛋白VP2、VP3に依存せずに単独でもウイルス様粒子(BK-VLPs)の形成ができることが明らかになった。効率よくBKVの増殖する培養細胞が無いと、組換えバキュロウイルス発現系による大量の純化されるBK-VLPsを簡単に得ることができたことはBKウイルスの構造解析や抗体測定系の樹立など大いに役経つことになる。

BKVP1はSV40、JCV、ポリオマーウイルスと同じ、N末端にペイシクなアミノ酸配列を持ち、核移行シグナルと呼ばれている。昆虫細胞で発現する場合でもは効率よく核に移行する。核移行シグナルを含むN末端の11アミノ酸残基を欠損させると核移行は阻止された。粒子の形成もできなくなった。合成された蛋白が核移行することはウイルス様粒子の形成には重要なステップであることが示唆された。

ネイティブなBKウイルス粒子と違い、昆虫細胞で形成されたBK-VLPsは均一ではない。サイズから見れば直径26nmと50nmの二種類があった。ウイルス形成にはCa⁺⁺が必要することがすでに同じポリオマーウイルスであるJCVの粒子形成の研究で証明されている。BKVP1蛋白が過剰発現されたため、粒子の形成に十分量のCa⁺⁺の提供ができなかったのは

その一つの原因だと考えられる。粒子の形態から中空粒子と非中空粒子の二種類が観察された。非中空粒子の中に分子量の違いの三種類のDNAの断片は含まれた。粒子の中に取り込まれたDNAの断片の性質がまだはっきり分かっていないが、本研究はDNAのpackagingメカニズムの有力なモデルとして期待できる。

SDS処理によりBKVP1蛋白が変性し、BK-VLPsの立体構造が破壊される。ELISA法及びドットプロット法を用いて、変性したBK-VLPsと未変性のBK-VLPsの抗原性を比較した結果、変性したウイルス様粒子とBKV抗体陽性のヒト血清との反応は著しく弱まった。この結果はBK-VLPsの抗原性は立体構造に依存することが示された。BK-VLPsはPH7-9.6の範囲で安定しているので、これを用いて抗体検出にはウェスタンブロット法よりELISA法が適切と考えられる。

E. 結論

BKVの組換え中空粒子を作出し、クリオ電顕で三次構造を解析した。この中空粒子を用いた抗体検出EIAによって健常日本人の抗体保有状況を明らかにすることができた。また抗原検出EIAを構築し、血性膀胱炎の診断に応用した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Kenzo Kato, Josefina Nilsson, Li Xing, Lars Haag, R Holland Cheng⁺, and Tatsuo Miyamura. *Virology*, in press.

2. 学会発表

国際学会

1. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. T.-C. Li, N. Takeda, L. Xing, L. Haag, J. Nilsson, R.H. Cheng, and T. Miyamura. XIIth International Congress of Virology. August 2002, Paris

国内学会

1. BKウイルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用 李 天成、加藤 賢三、武田 直和、宮村 達男 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002.10

H. 知的所有権の取得状況

なし

12. 劇症を示す G 群レンサ球菌の疫学と遺伝型別法の検討

分担研究者 渡辺 治雄 (国立感染症研究所細菌第一部長)

共同研究者 池辺 忠義 (国立感染症研究所細菌第一部)

研究要旨 近年、A 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症に加えて、同様の症状を示す G 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の症例が見られている。劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす G 群レンサ球菌に共通の因子があるか調べるため、*emm* 遺伝子型別、パルスフィールド電気泳動、病原性遺伝子の保有について調べた。1995 年から 2001 年に劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者から分離された G 群レンサ球菌 16 株について解析した。*emm* 遺伝子を調べたところほとんどが異なる型を保持していた。また、*SmaI* によるパルスフィールド電気泳動による解析でも多様性を示した。ところが、A 群レンサ球菌の病原性因子である *scpA*, *ska*, *slo*, *sagA*, *sla*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* 遺伝子の保有状況について調べたところ、全ての株が *scpA*, *ska*, *slo*, *sagA* 遺伝子を保持していた。

A. 研究目的

G 群レンサ球菌は、皮膚、咽頭などにみられるノーマルフローラの一部であり、咽頭炎、皮膚および軟部組織感染、関節炎、菌血症および心内膜炎を引き起こす。

1980 年後半から先進国ばかりでなく発展途上国においても A 群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症が問題となっている。初期症状としては、四肢の疼痛、腫脹、発熱、血圧低下などで、発病から病態の進行が非常に急激かつ劇的で、いったん発病すると数十時間以内には軟部組織壊死、急性腎不全、成人型呼吸窮迫症候群 (ARDS)、播種性血管内凝固症候群 (DIC)、多臓器不全 (MOF) を引き起こし、患者をショック症状から死に至らしめる。近年、これと同様の症状を示す症例が同じレンサ球菌属に属する G 群レンサ球菌によっても引き起こされることが報告されている。しかしながら、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす G 群レンサ球菌の菌学的特性および病原因子についての知見はほとんど得られていない。本研究では、菌学的特性および関連する病原因子を突き止め、その因子を診断用のマーカーに

使う系を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. 病原性遺伝子の検出および M タンパク質遺伝子 (*emm*) のシークエンスによる *emm* 遺伝子型別:
 - a. Genomic DNA の抽出は、依存の方法を用いた。
 - b. PCR による病原性遺伝子の増幅；プライマーとしては以下のものを用いて増幅させた。

Table. Primer sequences used to amplify the genes by PCR

gene	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')
<i>emm</i>	TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA	GCAAGTTCCTTCAGCTTGTTT
<i>speG</i>	AAGAAAATTTCTAATGGAAA	GTAGATATCAAAATGACTAA
<i>speJ</i>	TTTCATGGGTACGGAAGTG	TTATGTATGGAGAATTAGG

speI ACTCTACATATGATCCAACA
 TTATAAGAAATTCTCTCTCC
speH CAAATTCCTATAATACAACC
 CTAACCTTTTATATCCACTTC
speK GACGAAATTTTGGATAATAG
 CTAATCTTTAGAAAAATCTT
speL TTAATTTTCTTTGTTTGTGT
 ATGAGAAATTTTTTACACCA
speM CTAATTTTTAGAAAAATCTTC
 TCGCTTGCTCTATACACTAC
speA CTTCAAATATATATTTTC
 TAAATGATTCCCTTCATG
speB GATCAAAACTTTGCTCGTAACG
 AGGTTTGATGCCTACAACAGC
speC GACTCTAAGAAAGACATTTTCG
 AGTCCCTTCATTTGGTGAGTC
scpA CCATTTGATAAACTTGCC
 ATTAATCACCTTAGCTCCC
ska AGTCCAAAATCAAAACCATT
 AAATTCITGGACAGGTTGGG
sagA ACTTCAAATATTTTAGCTAC
 CTTCCGCTACCACCTTGAG
sla GAAGGGATAAATGATAAAATGG
 TTAACATCCTATAGAACCCTAC

c. PCR 反応

AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いた。

d. 反応条件

Pre : 95°C 10 min. (95°C 30 sec. 52°C
 30 sec. 72°C 1 min.) 30 cycles
 Post : 72°C 7 min. 4°C storage

e. PCR 産物の回収

High Pure PCR product purification kit (Roche)を用いて PCR 産物を回収した。

f. シークエンス反応

シークエンス用プライマー;
 emmseq2 : TAA TCG CTT AGA AAA
 TTA AAA ACA GG
 シークエンス反応試薬;
 BigDye Terminator Cycle Sequencing
 Ready Reaction Kit v2.0 (Applied
 Biosystems)
 を用いてシークエンス反応液を調製し
 た。PCR に用いた forward primer をシーク
 エンス用プライマーとして用いても
 シークエンスは可能である。

g. *emm* 遺伝子のシークエンシングの反応条件

Pre : 96°C 30 sec. (96°C 30 sec. 45°C
 10 sec. 60°C 4 min.) 25 cycles, 4°C
 storage

h. シークエンスデータの解析および型別

Center for Disease Control and Prevention
 (CDC) の *Strep* HOME, *Streptococcus*
pyogenes Database: (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.html>) より
 BLAST-*emm* の項を開き、必要事項
 (Requestor, Phone, Sample Identifier)、
 E-mail address およびシークエンスデー
 タを送付すると、サーチ結果をメールで
 得られる。

2. パルスフィールド電気泳動

制限酵素として *SmaI* を用いた。対象菌株は、
 劇症型レンサ球菌感染症およびその類似疾
 患と同様の症状を示す患者から分離された
 G 群レンサ球菌 16 株である。

C. & D. 研究結果と考察

1995 年から 2001 年の間に発生した劇症型溶血
 性レンサ球菌感染症を示す 16 人の患者から分
 離された G 群レンサ球菌 *Streptococcus*
dysgalactiae subsp. *equisimilis* を用いて解析を行
 った。G 群レンサ球菌の菌体表層には、群多糖
 体のほか M タンパク質が存在する。G 群レン
 サ球菌の M タンパク質は、それをコードする
 塩基配列から、少なくとも 23 種類存在するこ
 とが明らかとなっている。劇症型溶血性レンサ
 球菌感染症患者から分離された 16 株について
emm 遺伝子の塩基配列を調べた結果、*stg11*
 (3/16, 18.8%)、*stg485* (3/16, 18.8%)、*stg6.1*
 (3/16, 18.8%)、*stc36* (2/16, 12.5%)、*stg840* (2/16,
 12.5%)、*stg480* (1/16, 6.25%)、*stg652* (1/16,
 6.25%)、未同定の *emm* 遺伝子型 (1/16, 6.25%)
 であった。劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者
 分離株に特徴的な *emm* 遺伝子型は見られな
 かった。

G 群レンサ球菌の genomic DNA を制限酵素
SmaI で切断し、パルスフィールド電気泳動を
 行った。その結果、*stc36* 遺伝子型株について

は電気泳動のパターンに違いがみられなかったが、それ以外の劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株においては、*emm* 遺伝子型が同じであっても、それぞれの株で電気泳動のパターンが異なっていた。このことから、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす株には、多様性があることを示唆している。

劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こした G 群レンサ球菌が、*scpA*, *ska*, *slo*, *sagA*, *sla*, *speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* のような A 群レンサ球菌で同定されている病原性遺伝子を保有しているか否かを調べるため、それぞれの遺伝子を特異的に増幅できるプライマー (Table) を用いて PCR を行った。その結果、全ての株において、*scpA*, *ska*, *slo*, *sagA* の4つの遺伝子を保有していることが判明した。一方、*sla*, *speA*, *speB*, *speC*, *speH*, *speI*, *speJ*, *speK*, *speL*, *speM* 遺伝子は、どの株においても確認することができなかった。*speG* 遺伝子は、一部の株に見られた。全ての株が *scpA*, *ska*, *slo*, *sagA* 遺伝子を保有していたことから、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こした G 群レンサ球菌の検査にこれらの遺伝子を用いることができる可能性がある。しかしながら、今回の研究では、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こしていない G 群レンサ球菌の中におけるこれらの遺伝子の保有状況を調べていないので確実なことは不明である。もちろん、他の未知の遺伝子の関与も考慮する必要がある。

E. 結論

劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす G 群レンサ球菌には、*scpA*, *ska*, *slo*, *sagA* 遺伝子が保存されていた。G 群レンサ球菌の *emm* 遺伝子型別やパルスフィールド電気泳動による泳動パターンの解析は、菌の流行調査における研究に有用である。これらの方法は、より簡便であり、塩基配列の解析やパルスフィールド電気泳動ができる施設であれば何処でも可能であり、かつ精度管理も容易である。今後、地研等への普及を図る予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikebe, T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., Tamura, A., Fujinaga, Y., Abe, Y., Shimizu, Y., Watanabe, H. and The working group for group A streptococci in Japan. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 isolates in Japan. *Infect. Immun.* 70: 3227-3233, 2002.
2. Ikebe, T., Murai, N., Endo, M., Okuno, R., Murayama, S., Saitoh, K., Yamai, S., Suzuki, R., Isobe, J., Tanaka, D., Katsukawa, C., Tamaru, A., Katayama, A., Fujinaga, Y., Hoashi, K., Ishikawa, J., Watanabe, H., and The working group for group A streptococci in Japan. Changing prevalent T serotypes and *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock-like syndrome (TSL) patients in Japan. *Epidemiol. Infect.*, in press.

2. 学会発表

1. Ikebe, T., Miyoshi-Akiyama, T., Wada, A., Kato, H., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., Tamura, A., Fujinaga, Y., Abe, Y., Shimizu, Y., Uchiyama, T. and Watanabe, H. The dissemination of the novel superantigen gene *speL* in M3/T3 *Streptococcus pyogenes* isolates in Japan. 6th ASM Conference on Streptococcal Genetics. Asheville, 2002.
2. 池辺忠義、山井志朗、鈴木理恵子、磯部順子、田中大祐、田丸亜貴、片山淳、藤永良博、帆足喜久雄、渡辺治雄。日本における A 群溶血レンサ球菌サーベイランス 1996-2000 日本細菌学会総会 横浜 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

13. アルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立と標準化に関する研究

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

協力研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨 ウエストナイルウイルスは現在日本には侵入しておらず、日本においては輸入症例の報告もないが、米国においては2002年に3,000人を越す患者発生が報告され大きな問題となっている。ウエストナイルウイルスは他のフラビウイルスと抗原性が交叉するが、日本においては特に日本脳炎ウイルスとの交叉が問題となる。本研究においてはウエストナイル熱の血清診断法としてウエストナイルウイルス抗体に対する中和法を確立し、さらに中和法によってウエストナイルと日本脳炎ウイルス感染の鑑別が可能であることを確認することを示した。中和法をこれまでに確立したIgM捕捉ELISA法、およびPCR法等と組み合わせることにより、発症後の血清採取時期によらず実験室診断を行う。

A. 研究目的

日本人海外渡航者の増加に伴い、熱帯・亜熱帯地域において節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）に感染し、帰国後発症する例が多く見られる。ウエストナイルウイルスは現在日本には侵入しておらず、日本においては輸入症例の報告もないが、米国においては2002年に3,000人を越す患者発生が報告され大きな問題となっている。ウエストナイルウイルスは抗原性が日本脳炎ウイルスと極めて類似している。日本にウエストナイルウイルスが侵入した場合、あるいは海外渡航者による輸入症例が発生した場合は、主に日本脳炎との鑑別を可能とする血清診断法の開発が必要となる。本研究においては血清診断法として特異性の高い中和法を確立し、さらに中和法によってウエストナイルと日本脳炎ウイルス感染が鑑別可能であることを確認することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) ウエストナイル熱患者血清9検体（米国CDCより分与）と日本脳炎患者血清10検体を使用した。
- 2) ウエストナイルウイルス抗体の中和法はウエストナイルウイルスを用い日本脳炎ウイルス抗体中和法に基づいて確立した。
- 3) 上記血清の抗体価を両法によって測定した。

C. 研究結果

- 1) 上記ウエストナイル熱患者血清9検体は昨年度報告したウエストナイルウイルスIgM捕捉ELISA法によって、いずれもIgM陽性と判定され、ウエストナイルウイルス抗体陽性であることが確認された。

- 2) ウエストナイル熱患者血清9検体はすべてウエストナイルウイルスに対して高い中和抗体価を示した。このうち7検体は日本脳炎ウイルスに対しても中和活性を示したが、日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価はウエストナイルウイルスに対する抗体価のほぼ1/10以下であった。
- 3) 日本脳炎患者血清10検体は日本脳炎ウイルスに対して高い中和抗体価を示した。これらの検体はすべてウエストナイルウイルスにたいしても中和活性を示したが、抗体価は日本脳炎ウイルスに対する抗体価のほぼ1/10以下であった。

D. 考察

ウエストナイルウイルスはアフリカ、西アジア、ヨーロッパ、北アメリカに分布し、通常急性熱性疾患であるウエストナイル熱を発症するが、特に高齢者においては重症化し脳炎を発症する。ウエストナイルウイルスは特に日本脳炎ウイルスと抗原性が類似しているため、日本にウエストナイルウイルスが侵入した場合、あるいは海外渡航からの帰国者にウエストナイル熱の発症が疑われた場合、日本脳炎との鑑別を可能にする検査法の確立と標準化が必要となる。ウエストナイル熱患者血清、日本脳炎患者血清は、IgM捕捉ELISA法と中和法いずれの方法によっても、それぞれ日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスに対する交叉反応を示す。しかし、いずれのアッセイ法においても交叉反応は本来のウイルスに対するより低地であるため、両抗原を用いることによって区別できる。これまでの研究から、PCRによる遺伝子検出法も確立されており、遺伝子診断法と組み合わせることにより、発症後の血清採取時期によらず実験室診断を行いうる。

E. 結論

ウエストナイル熱の血清診断法としてウエストナイルウイルス抗体も中和法を確立し、さらにほん中和法によってウエストナイルと日本脳炎ウイルス感染が鑑別可能であることを確認することを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Nerome, R., Arai, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.: The features of imported dengue fever cases confirmed at National Institute of Infectious diseases, Japan, during 2001. Dengue Bulletin. Vol 26: In press, 2002
2. 伊藤美佳子、倉根一郎：西ナイル熱、西ナイル脳炎. 小児科診療 65: 2083-2086, 2002
3. Takahashi, M., Miwa, T., Yamada, K., Sato, Y., Ikawa, K., Matsumoto, Y., Sano, T., Takasaki, T., Nerome, R., Ito, M., and Kurane, I.: Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo international airport. Japanese Journal of Infectious Diseases. In press. 2003

2. 学会発表

1. 倉根一郎、高崎智彦：新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状. 第43回日本熱帯医学界大会 2002年9月

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1. ウエストナイル熱と日本脳炎患者血清のウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価

患者番号	中和抗体価	
	ウエストナイルウイルス	日本脳炎ウイルス
ウエストナイル熱患者		
1	>640	50
2	>640	20
3	>640	80
4	>640	30
5	>640	<20
6	>640	160
7	>640	80
8	640	40
9	320	<20
日本脳炎患者		
11	60	>3840
12	60	960
13	60	960
14	240	>3840
15	60	240
16	60	3840
17	240	>3840
18	60	>3840
19	60	>3840
20	240	>3840

14. ピコルナウイルス感染症の感染病理学的診断法の開発

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

共同研究者 永田 典代(国立感染症研究所感染病理部)、岩崎 琢也(長崎大学)

研究要旨 ピコルナウイルス感染症の中で、特に中枢神経系に病原性を発揮することが知られているエンテロウイルス 71 (EV71) の感染病理学的鑑別診断法の開発を目的にした。EV71 と同様に手足口病の原因となるコクサッキーA16 (CA16) と弛緩性麻痺を発症するポリオウイルス (PV) に的を絞り、これらのウイルスについてパラフィン切片を用いた病理組織学的診断に有用なポリクローナル抗体および陽性コントロール組織標本を作製した。また、パラフィン切片からの total RNA 抽出を行い、RT-PCR 法によるウイルスゲノムの検出方法も確立した。これらの材料はエンテロウイルスの感染が疑われる患者検体の診断に際して陽性対照として用いることができることが判明した。

A. 研究目的

近年、マレーシア、台湾でエンテロウイルス 71 (EV71) 感染による重篤な中枢神経系疾患が大流行し、剖検により病態が明らかにされた症例が報告されてきた。本邦でも、数は少ないものの、重篤例や死亡例が報告されている。しかし、現在までにこれらの剖検例において確実にウイルス感染を診断することは病理組織学的には非常に困難であった。

そこで今年度は、EV71 と同様に手足口病の原因となるコクサッキーA16 (CA16)、弛緩性麻痺を発症するポリオウイルス (PV) に的を絞り、これらのウイルスについて病理組織学的診断に用いることができる抗体の開発と組織診断系の開発を目的とした。

B. 研究方法

1) ウサギ免疫血清の作製

EV71 (C7 株、1095 株) および PV(Mahoney 株)を精製し 1mg/ml に調整した (ウイルス第二部清水博之、神経研小池智先生から分与)。精製粒子に 0.5%SDS を加え、80℃10

分間で熱変性処理したのち、PBS で 5 倍希釈し Freund's complete もしくは incomplete アジュバンドを加え、ウサギの皮下に 3 週間隔で 5 回以上免疫した。

2) 陽性対照切片の作製

EV71 あるいは PV を感染させた Vero 細胞を準備し、感染細胞のパラフィンブロックを作製した。

EV71、CA16 あるいは PV を実験的に感染させた小動物 (乳のみマウス、ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス TgPVR21 マウス、カニクイザル) のパラフィン組織切片を作製した。

3) 免疫組織化学

パラフィン切片を用いてウイルス抗原の検出を sABC 法で行った。

脱パラフィン後、37℃30 分間トリプシン処理を行い、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの阻止を室温 30 分間行なった。燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、ヤギ正常血清と 5 分間反応し、その後適宜希釈した一

次抗体ウサギ血清と 4°C一晩反応させた。PBS 洗浄後、ビオチン化抗ウサギ抗体ヤギ血清と室温 30 分反応させ、洗浄後にストレプトアビジンペルオキシダーゼと室温で 30 分間反応させた。さらに洗浄後、Diaminobenzidine による可視化をおこない、ヘマトキシリンで対比染色した。

4) パラフィン切片からの RNA 抽出

10 μ m 厚のパラフィン切片を 2 枚マイクロチューブに準備し、蛋白分解酵素を用いた組織切片中の全 RNA 抽出を試みた。パラフィン切片は次のとおり作成した。

EV71、CA16 を 10^6 CCID₅₀ 量脳内接種した乳のみマウスを、EV71 は接種後 3 日目、CA16 は接種後 8 日目に発症を確認してから過麻酔殺後、解剖に供した。通常の 10%ホルマリン緩衝液で心臓からの還流固定後、脳を含んだ頭部組織を採取し、さらに 2 日間浸漬固定を行い 5mm の厚さで組織を切り出し、続いて EDTA4Na 緩衝液により 1 週間脱灰処理したものである。

また、PV を TgPVR21 に 10^6 CCID₅₀ 静脈内接種したのち接種後 8 日目に麻痺発症を確認したので、過麻酔殺後、脳組織を取り出し、ホルマリン緩衝液に 1 週間以上、浸漬固定を行った。

これらの組織材料を通常の方法でパラフィン包埋したのち、RNase 非存在下で薄切を行い組織切片を作成した。つづいてマイクロチューブ中のパラフィン切片をキシレン (30 分 3 回) で脱パラフィンしたのち、100%エタノール (10 分 3 回) で処理した。その後酵素反応を 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)、0.5%SDS、0.2mg/ml proteinase K で 42°C一晩行った。組織の消化を確認後、guanidium thiocyanate を含む Denaturing solution、2M Sodium Acetate、pH4.0 および phenol: chloroform: isoamyl alcohol 混合液を加えて組織中の RNA 抽出を行った。水相に isopropanol を加えて RNA を沈殿させてエタノールで洗浄後乾燥し、エタノールを除去してから蒸留水に溶解した。RNA 抽出には RNAagents Total RNA Isolation System (Promega) を用い、添付されているプロトコールに基づいて作業を行

った。

5) エンテロウイルスの 5'末端遺伝子領域の増幅

パラフィン切片から抽出した RNA を用いて、RT-PCR を試みた。プライマーは 5'末端非翻訳領域におけるエンテロウイルスに共通の部分を選択した。

まず、抽出した RNA から random primer あるいは oligo primer を用いて cDNA 合成を行った。ImProm-II reverse transcription system (Promega) を用いてメーカーのプロトコールにより逆転写反応を行った。逆転写反応の進行確認のために、キット中の陽性コントロールを用いた。

つづいて合成した cDNA から、選択したプライマーを用いて PCR による増幅を行った (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems)。使用したプライマーは次のとおりである。PV1-EVall/449/F 5'-GGC CCC TGA ATG CGG CTA AT-3'、PV1-EVall/596/R 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'。増幅は 94°C30 秒、60°Cあるいは 55°C1 分、72°C 2 分で 40 サイクル行った。期待される増幅産物の長さは 149bp であり、PCR 産物の長さは 3%アガロースゲルを用いた電気泳動によって確認した。

C. 研究結果

作製した抗 EV71 および PV ポリクローナル抗体は希釈倍率 1,000 倍以上で ABC 法による免疫組織化学でシグナルが得られ、有用であった。EV71 感染患者組織における有用性も確認され、ウイルス感染神経細胞の細胞質にウイルス抗原が検出された。しかしながら、抗 EV71 抗体を用いて CA16 感染マウスの組織で免疫染色を行ったところ、感染筋組織において交差反応が明らかとなった (表 1 および図 1)。そこで、パラフィン切片からの RNA 抽出と RT-PCR によるウイルスゲノムの検出を確立し、その後のシーケンス解析によりウイルスの同定を可能にすることにした。

パラフィン切片を脱パラフィン後、proteinase K 処理を行い、つづいて phenol: chloroform:

isoamyl alcohol を用いた通常の RNA 抽出を行い (図 2)、さらに RT-PCR を行うことによってピコルナウイルスの非翻訳領域の一部が増幅できた (図 3、4)。逆転写反応には oligo-dT および random プライマーを用いたが、結果に大きな差は見られなかった (データは示さない)。

D. 考察

今回作成したポリクローナル抗体は感染症が疑われる患者組織のスクリーニングに適している。また、今回 RT-PCR に使用したプライマーは現在シーケンスが明らかとなっている主なピコルナウイルスに共通の塩基配列部位を選択したため、臨床検体の検討に適している。感染小動物組織で作成したパラフィン切片は免疫組織化学法やゲノム解析に有用な陽性対照として用いることができる。

患者臨床検体のパラフィン切片からの RNA 抽出は最近、種々のウイルス感染症で試みられており、今後は診断系のひとつとして活用が期待される。ただし、RNA 抽出の容易さは経験的にホルマリン固定の期間に左右され、パラフィン包埋されてからの組織中の RNA の保存は安定と考えられている。今回用いた CA16 および EV71 感染組織は EDTA4Na 緩衝液による脱灰処理を 1 週間程度行ったが、RNA の安定性に影響はなかった。PV 感染組織でゲノム検出量が比較的乏しかったが、これはホルマリン緩衝液による固定が他に比較して長期 (1 週間以上、他は 2 日以内で、しかも一次固定として還流固定を行った) であったことが要因と考えられる。

E. 結論

EV71 および PV に反応し、パラフィン切片における免疫組織化学に使用可能なポリクローナル抗体を作成した。また、CA16、EV71、PV 感染動物組織を用いてホルマリン固定—パラフィン包埋材料を作成した。この材料は免疫組織学的あるいは RT-PCR によるウイルスゲノムの解析の陽性コントロールとなり、感染症を疑われた患者検体の鑑別診断に有用である。

当然であるが、今回行った RT-PCR に引き続き、ダイレクトシーケンス等の解析が診断の決

定には必要であり、今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. J Med Virol. 2002 Jun; 67(2): 207-16.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図表について

表 1

パラフィン切片を用いた免疫組織化学によるポリクローナル抗体の交差反応性を示した。抗 EV71 抗体は CA16 感染マウス組織において交差反応性を示した。抗 PV 抗体は特異性を示した。

図 1

CA16 脳内接種後 8 日目の乳のみマウスの骨格筋組織における抗 EV71 抗体の交差反応性を示した。

図 2

パラフィン切片からの RNA 抽出の具体的なプロトコールをフローチャートで示した。

図 3

RT-PCR に用いたプライマーの領域を示した。5'末端の非翻訳領域に存在する PV、EV71、CA16 その他のほとんどのエンテロウイルスに共通な領域を選択した。

図 4

エンテロウイルス感染動物のホルマリン固定—パラフィン包埋切片由来の RNA を用いた RT-PCR の結果を示した。

- A: 今回用いたパラフィン組織の HE 染色肉眼写真
- B: 左から分子量マーカー、RT システムのネガティブコントロール、ポジティブコントロール（目的の PCR 産物は 323bp）、CA16、EV71、PV1 感染動物サンプル（目的の PCR 産物はいずれも 149bp）、PCR ネガティブコントロール、分子量マーカーである。目的の増幅産物が確認できた。

Table 1

Cross reactivity of polyclonal antibody with enteroviruses

		Infected tissue		
		CA16	EV71	PV
anti CA16		NE	NE	NE
anti EV71		+	+	-
anti PV		-	-	+

Fig. 1

Striated muscle cells of suckling mouse with CA16, 8ds p.i.

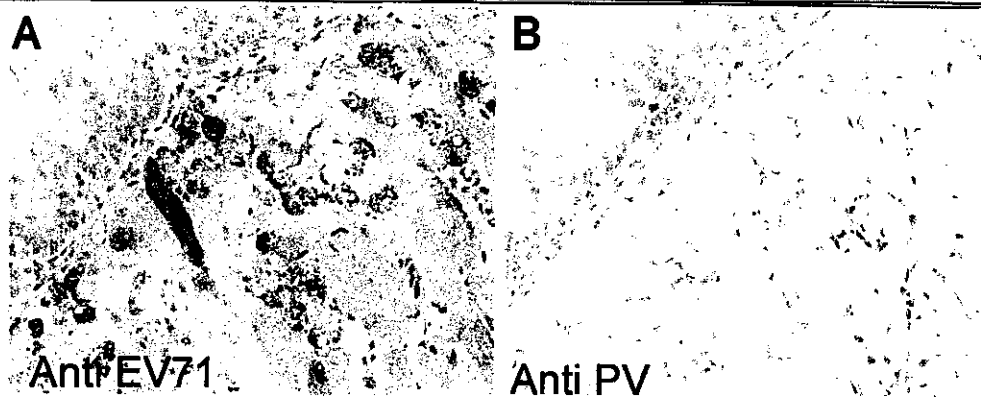


Fig. 2

Isolation of RNA from tissue

Soguero et al., Lab Invest 2000, 80:851-856

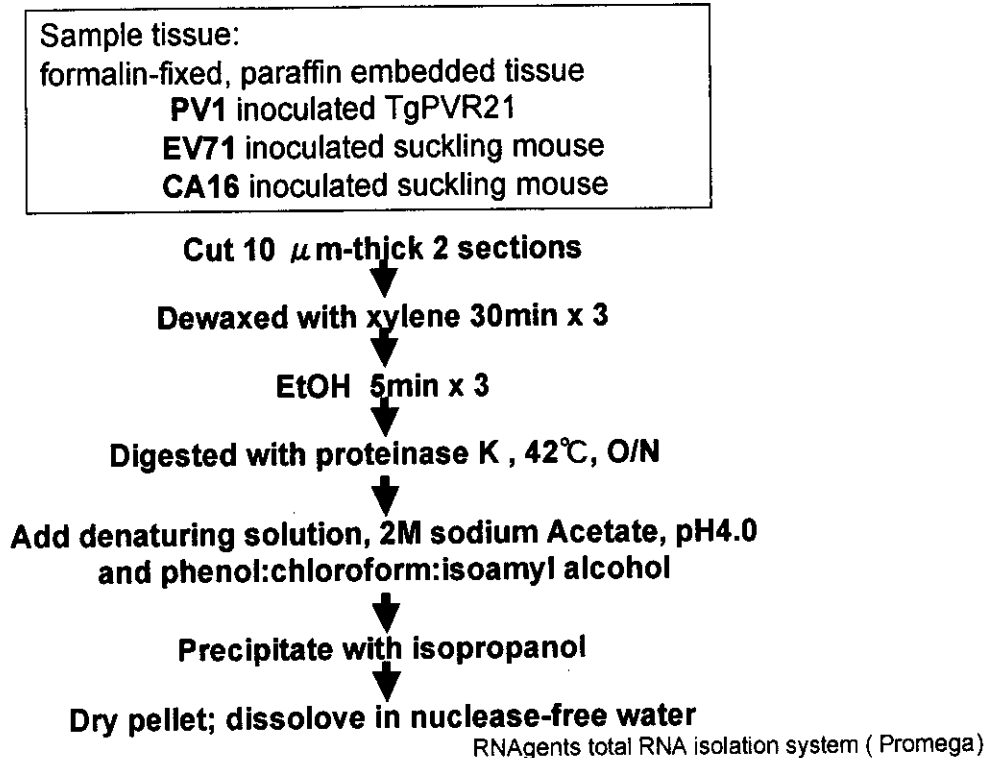


Fig. 3

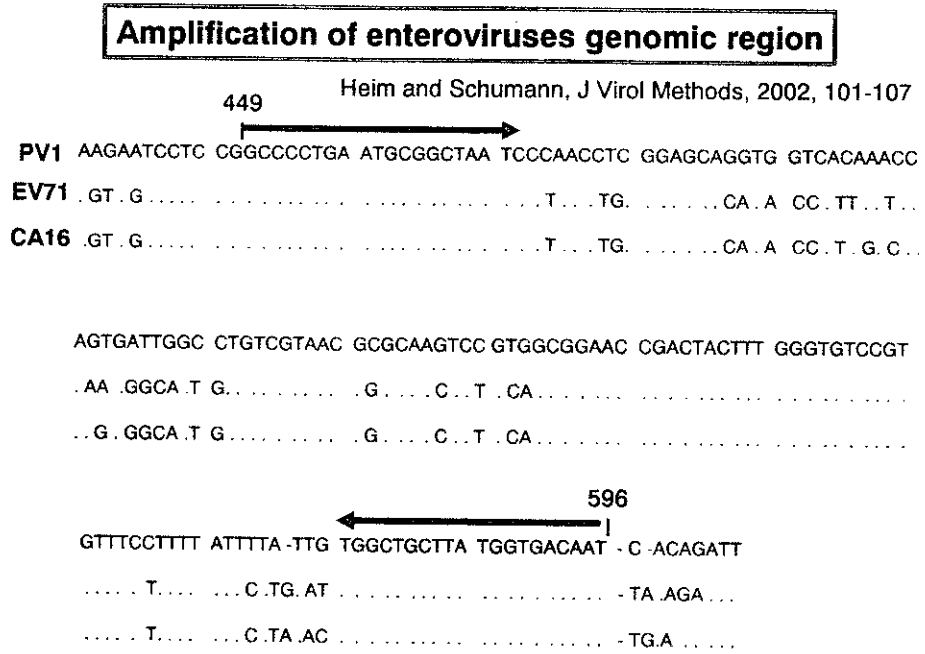
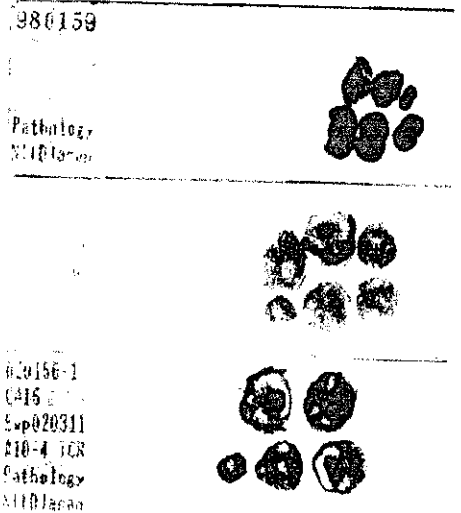


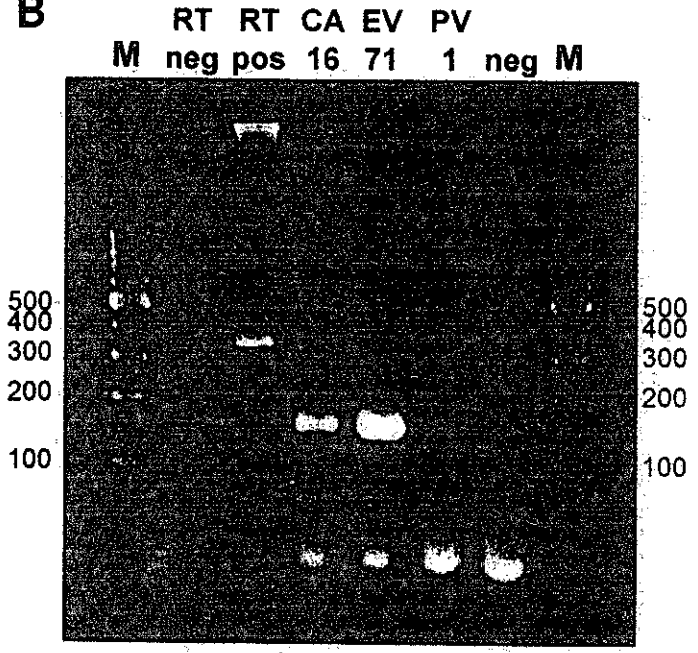
Fig. 4

RT-PCR amplification of the 5'NCR of enteroviruses in formalin-fixed, paraffin embedded cranial tissue

A



B



Annealing 60°C, 40 cycles, 3% agar

15. セフトキシム耐性を付与する CTX-M- 型 β -ラクタマーゼの識別

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症研究所細菌第二部長）

研究協力者 柴田 尚宏、土井 洋平、山根 一和、八木 哲也
（国立感染症研究所細菌第二部）

研究要旨 近年、欧米では、セフトジジム（CAZ）やセフトキシム（CTX）などの第三世代セファロスポリンに耐性を獲得した肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）や大腸菌（*Escherichia coli*）が増加し、これらの多くは、いわゆるESBL（Extended-spectrum β -lactamase：基質拡張型 β -ラクタマーゼ）を産生する株と考えられている。我が国では、この種の耐性株は未だ希である。しかし、国内では、CTXに高い分解活性を示すもののCAZなどは殆ど分解できないCTX-M-型 β -ラクタマーゼ産生株が臨床現場で多く分離される傾向がある。

ESBLとCTX-M-型 β -ラクタマーゼは、クラスA型 β -ラクタマーゼに属し、ともにクラバン酸により強く阻害されるが、分解可能な β -ラクタム薬のスペクトルが若干異なる為、臨床的に識別が必要となっている。今回、我々は、ESBLとCTX-M-型 β -ラクタマーゼを識別する試験・検査法を開発し一般の細菌検査室に普及すべく、臨床分離菌における β -ラクタム薬耐性のパターンや阻害剤に対する挙動などの表現型から、それらを簡便に鑑別、識別する方法を検討した。具体的には、表現型と遺伝子型を対比させつつ、詳細なバリエーション型を確定し、そのデータを蓄積した。その結果、CTX-M-型 β -ラクタマーゼには、全てスルバクタム（SBT）により阻害され難いという特徴に着目することでSBTに阻害されるESBL産生株と大まかに識別する事が可能であることが示唆され、簡便にこの種の拡張型 β -ラクタマーゼ産生株を識別する事が可能となることが期待された。

A. 研究目的

欧米の臨床現場では、セフトジジム（CAZ）やセフトキシム（CTX）などの第三世代セファロスポリンに耐性を獲得した肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）や大腸菌（*Escherichia coli*）が増加し、たとえば米国のNNIS/CDCの2000年の調査では、米国内の集中治療室（ICU）で院内感染症を引き起こした*K. pneumoniae*の11.2%が、第三世代セファロスポリン耐性を獲得していると報告されている。

これらの多くは、いわゆるESBL（Extended-spectrum β -lactamase：基質拡張型 β -ラクタマーゼ）を産生する株と考えられているが、我が国では、この種の耐性株は未だ希である。しかし、国内では、CTXに高い分解活

性を示すもののCAZなどは殆ど分解できないCTX-M-型 β -ラクタマーゼが臨床現場で多く分離される傾向がみられる。これまで、我が国におけるCTXやCAZなどoxy-imino系 β -ラクタムに耐性を示すいわゆる広義のESBLs（extended spectrum β -lactamases）産生菌としては、CTX-M-2型 β -ラクタマーゼが多いとされてきた。また欧米で問題となっているTEM-、SHV-型 β -ラクタマーゼ産生菌に関しては、SHV-12型やTEM-10型 β -ラクタマーゼ産生株などが報告され始めている。一方、CTX-M-型 β -ラクタマーゼには、既にCTX-M-1からCTX-M-25までのバリエーション型が確認されており、これらはその遺伝子の相同性から4つの遺伝子型に分類されるが、我が国におけるこうした β -ラクタマーゼ産生菌の遺伝子型別は行われていない。今回我々は、臨床分離株の遺伝子型

別を行うとともに、簡便な検査法の開発を試みた。具体的には、それらは、全てスルバクタム（SBT）により阻害され難いという特徴に着目することでSBTに阻害されるTEM-、SHV-型ESBL産生株と大まかに識別する事が可能かどうか検討した。

B. 研究方法

検査対象：2001年10月より2003年1月まで日本各地で臨床分離されたNCCLSのスクリーニング基準を満たすESBLs産生菌疑いの株161株を検査対象とした。（19都道府県、35医療施設）

1. ディスク拡散法（Twin test）

CAZおよびCTXとクラブラン酸、SBTに対する阻害効果を調べるため、ディスク拡散法（Twin test）による表現型の確認を行った。（図1）

2. CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーを用いたPCR法とシーケンス解析

CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ遺伝子は、その遺伝子の相同性から4つの遺伝子型に分類されると考えられるため、CTX-M-1タイプ、CTX-M-2タイプ、CTX-M-8タイプ、CTX-M-9タイプ特異的プライマーを作成し、PCR法による遺伝子型別を行い、さらにPCR productのダイレクトシーケンスも行った。プライマーデザインと反応条件は図2に示す。

C. 研究結果

1. CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ産生菌の国内分離状況と遺伝子型別

今回の解析の結果、CTX-M-1タイプ、CTX-M-2タイプおよびCTX-M-9タイプの3つに分類できた。シーケンス解析により、それらはCTX-M-2型、CTX-M-3型、CTX-M-9型が大半を占めていることが明らかとなった。（図3）

2. ディスク拡散法の結果

ディスク拡散法（Twin test）と遺伝子型と比較検討を行ったところ、図のごとく、TEM-、SHV-型ESBL産生菌は、クラブ

ラン酸とSBT双方に阻害効果を認めるのに対し、CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ産生菌は、いずれの遺伝子型においてもSBTには阻害効果を認めなかった。（図4、5）

D. 考察

1. CTX-Mタイプβ-ラクタマーゼ産生株を検出するには、ディスク法を用いたディスク拡散法（Twin test）が簡便であり有用であると考えられた。すなわち、CAZよりCTXに耐性でありスルバクタム/アンピシリンに阻害がかからないものはCTX-Mタイプβ-ラクタマーゼ遺伝子を有すると考えられ、SBT含有ディスクにより、TEM、SHV型ESBLs産生株と簡便に区別できる可能性が示唆された。

2. CTX-Mタイプβ-ラクタマーゼ産生菌は、CTX-M-1タイプ、CTX-M-2タイプ、CTX-M-8タイプ、CTX-M-9タイプの4つのグループに分類され、そのうちM-1、M-2、M-9の3つのグループに属する菌株が同定された。シーケンスにより従来Toho-1型β-ラクタマーゼ産生株と思われていた株は、すべてCTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生株であることが明らかとなった。また、CTX-M-1タイプでは、CTX-M-1型も存在するものの、我が国ではCTX-M-3型β-ラクタマーゼ産生株が多いことが明らかとなった。さらにCTX-M-9系β-ラクタマーゼ産生株も散在していることが明らかとなった。（図6）

3. CTX-M-1系に属する新しいβ-ラクタマーゼの存在も疑われた。

E. 結論

CAZやCTXなどのいわゆる第三世代セファロスポリン系抗生物質に耐性を付与する遺伝子は、多くの場合、伝達性プラスミド上により担われており、特定の医療施設内における院内感染の危険性だけでなく、この種の耐性遺伝子を保有する細菌の全国的な拡散が憂慮される。保有する耐性遺伝子の種類により、治療に用いる抗菌薬の種類が微妙に異なる為、臨床検査室の現場で、簡便な耐性遺伝子の型別や識別を行うことが必要となっており、本研究の成果は、より迅速な耐性菌の情報を確保し、適正な抗菌薬の使用にも寄与すること

ができると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohkawa T, Yoshinaga M, Ikarimoto N, Miyanohara H, Miyata K, Doi Y, Shibata N, Arakawa Y.: Characterization of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains that produce CTX-M-2-type broad spectrum β -lactamase isolated from a child with leukemia. *Pediatr Infect Dis J.* 2002 Mar; 21(3): 260

2. 学会発表

1. Genotyping of CTX-M Type Class A β -Lactamases Detected in Japan.: Naohiro Shibata, Y. Doi, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa : 41th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept. 24, 2001, Chicago, USA
2. 折田環、山本剛、木下承皓、柴田尚宏、荒川宜親：兵庫県下13施設における Extended Spectrum β -lactamase 産生菌の検出状況、第50回日本医学検査学会総会、東京、5月2001年
3. 宮本仁志、井上千春、村上忍、村瀬光春、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離されたESBLs産生株について、第50回日本医学検査学会総会、東京、5月2001年
4. 吉川綾子、柴田尚宏、荒川宜親：当院でESBLs産生菌を検出した症例についての検討、第50回日本医学検査学会総会、東京、5月2001年

H. 知的所有権の取得状況

なし

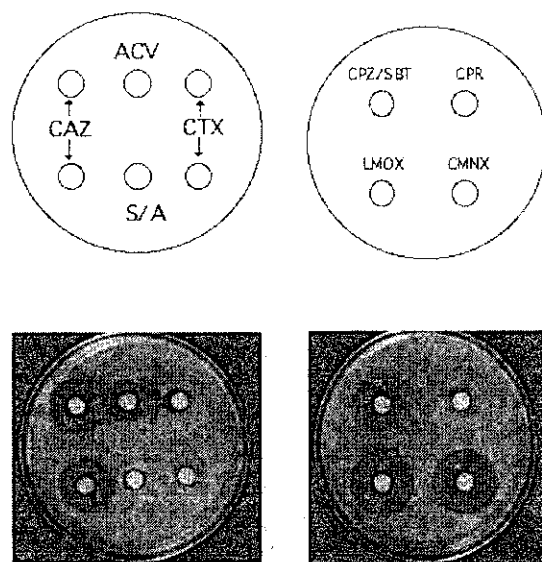


図 1. ディスク拡散法(Twin test)における阻害効果

CTX-M-1系検出プライマー

M1A cggtgctgaagaaaagtg
M1B taccacagctcagattac

CTX-M-2系検出プライマー

M2A gcagataatacgcaggtg
M2B cgccgtggtggtgtctct

CTX-M-8系検出プライマー

M8A cggatcatgctaatacacaac
M8B cctgtattcgctgttgctgt

CTX-M-9系検出プライマー

M9A gcagataatacgcaggtg
M9B cgccgtggtggtgtctct

PCR反応条件

distiled water 30 μ l
10 x buffer 5 μ l
dNTP 4 μ l
primer1 0.5 μ l
primer2 0.5 μ l
Taq polymerase 0/25 μ l
DNA template 10 μ l

denature 94°C 2min

denature 94°C 1min

anealing 53°C 1min

extension 72°C 1.5min

extension 72°C 5min

30cycles

図 2. PCR 法プライマーデザインと反応条件

菌種	CTX-M-1 タイプ	CTX-M-2 タイプ	CTX-M-9 タイプ	計
<i>E. coli</i>	14	35	35	84
<i>K. pneumoniae</i>	8	20	6	34
<i>Proteus mirabilis</i>	0	29	0	29
<i>Serratia marcescens</i>	6	1	0	7
<i>K. oxytoca</i>	0	1	1	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	2	0	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	2	0	2
<i>Providencia rettgeri</i>	0	1	0	1
計	28	91	42	161

図 3. CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼ産生菌の分離状況と遺伝子型別

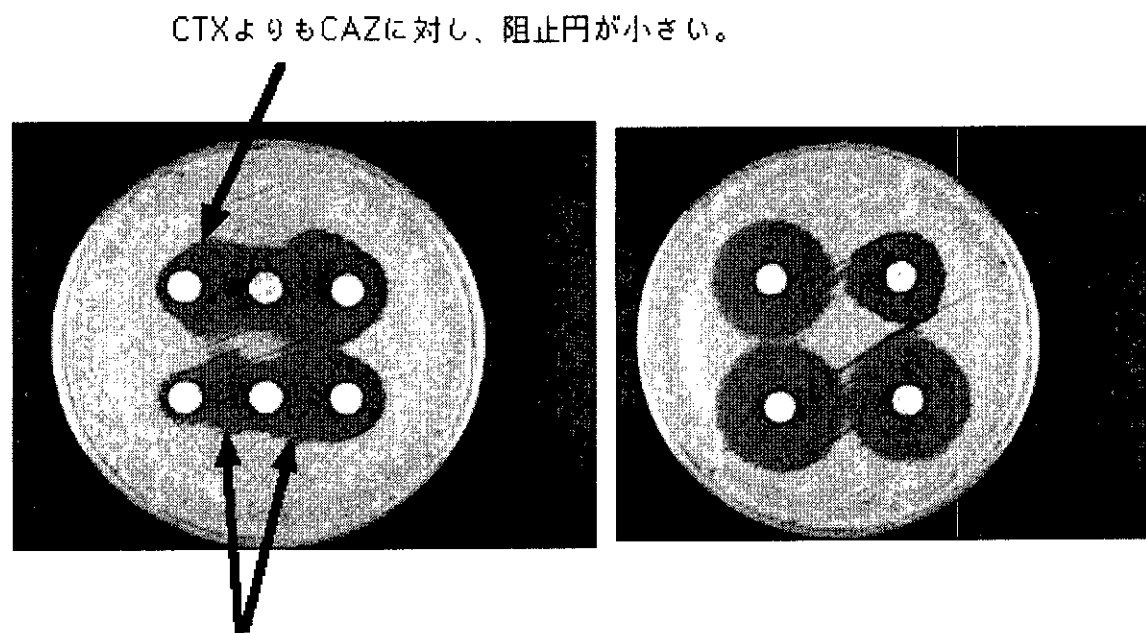
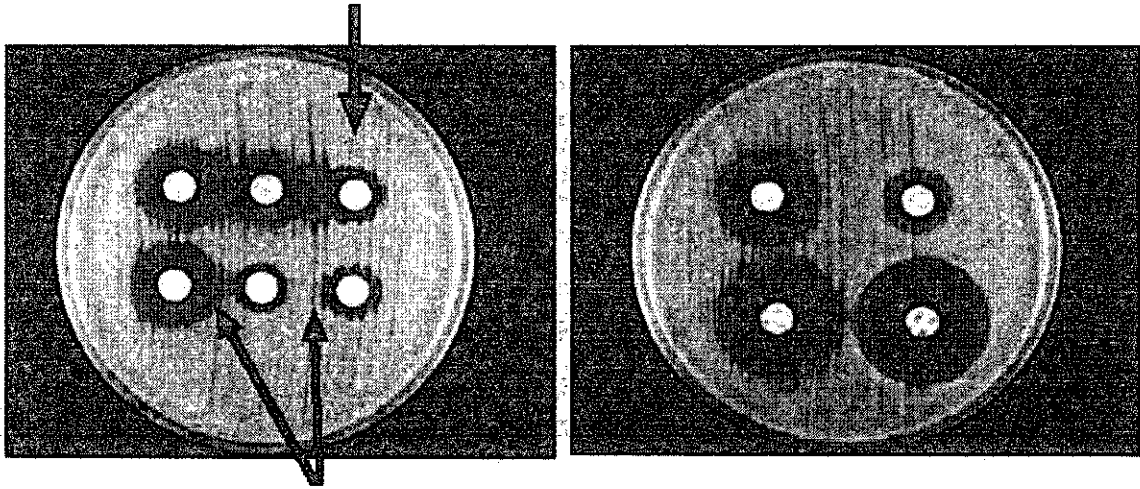


図4. TEM-, SHV-型 ESBL 産生菌のディスク拡散法における阻害効果

CTXに対して阻止円が小さい。



スルバクタムによって阻害されにくい。

図5. CTX-M-タイプ β -ラクタマーゼ産生菌のディスク拡散法における阻害効果