

## 分担研究報告書

鶏卵における *Coxiella burnetii* の検出法の開発と汚染実態に関する研究

分担研究者 岸本寿男 国立感染症研究所

研究協力者 小川基彦 国立感染症研究所

### 要 旨

最近、感染源に関して鶏卵から本菌が検出されたというデータが示され、早急に実態を解明する必要性に迫られた。そこで、一度に大量の検体が判定可能な Real Time PCR を基盤とした検出法を開発することを目的とした。

計 4 組のプロープおよびプライマーを作成した。それぞれの配列は、QompF1 5'-CGC TGC CAA AGT ATC ATT AGC A-3', QompR1 5'-CGC GTC GTG GAA AGC ATA A-3', QompP1 5'-ATT TTC CTT GTT TAG CG-3', QompF2 5'-ATA GCC GCC CCC TCT CAA T -3', QompR2 5'-TCT ACT AAA ACT TCT GGG TGG TTG ACT -3', QompP2 5'-AGT CAA AGA CAT ACA AAG C -3', QISF1 5'-CAC CAA TGG TGG CCA ATT TAA -3', QISR1 5'-AAA GAA AGC GGT TGC ATT CG -3', QISP1 5'-ATA TCC GGC ATC ACG A -3', QISF2 5'-GCG AGC GTG GGT GAC ATT -3', QISR2 5'-ACC CAA TAA ACG CCG ACA AC -3', QompP2 5'-ATC AAT TTC ATC GTT CCC GG -3'である。今回設計した IS 遺伝子に対するプライマーおよびプロープ IS1RT が最も感度が高く、0.01〜0.1 個の菌が検出可能であった。今後、他の細菌やゲノムに対する反応を解析し、特異性について検討する必要がある。また、実際の検出感度は、検体からの DNA 抽出の高率に大きく左右されるので、それぞれの食品や関連製品に適した抽出法を検討する必要もある。

### A. 研究目的

わが国では、1988 年医学留学生が帰国後に発症し、最初の Q 熱の症例として報告された。これを契機に国内での疫学調査が進み、わが国にも動物やヒトに広く Q 熱が存在することが明らかとなり、1999 年からは感染症法による第四類全数届出疾患として届出が始まった。これまでの国内症例をみると、①レトロスペクティブな疫学調査のデータから推察される数より患者数が少ない。②家畜や愛玩動物を原因としたアウトブレイクが少ない。③都市部での散発例が多く、感染源が特定できない。④患者の症状が穏やかで抗体価の上昇が顕著でないなどの特徴があった。そこで指摘されてきたのが、①わが国の流行株が諸外国のものと異なる可能性、③検査法の開発および改良

の必要性, ②不顕性感染者や食品など潜在的感染源が存在する可能性などであり, これらが現在のQ熱研究のコンセプトになっている。

特に最近, 感染源に関して鶏卵から本菌が検出されたというデータが示され, 早急に実態を解明する必要性に迫られた。検出法の開発にあたり, ①高感度かつ特性が高いこと, ②一度に多くの検体が処理できること, ③迅速で労力がかからないことなどが重要な点となる。

そこで本研究では, 一度に大量の検体が判定可能な Real Time PCR を基盤とした検出法を開発することを目的とした。現在までの途中経過を報告する。

## B. 材料および方法

### 1. TaqManMGB プローブおよびプライマーの設計

*C.burnetii* NM 株の外膜蛋白質(*com1*)およびインサージョン配列(IS1111a)に対するプローブとプライマーを Primer Express ソフトウェア(Applied Biosystems)を用いて設計した。最終的に, 他の菌やヒトゲノムへのホモロジーが極めて低く, *C.burnetii* のみに特異性が高い各 2 組, 計 4 組のプローブおよびプライマーを作成した。それぞれの配列は, QompF1 5'-CGC TGC CAA AGT ATC ATT AGC A-3', QompR1 5'- CGC GTC GTG GAA AGC ATA A-3', QompP1 5'- ATT TTC CTT GTT TAG CG-3', QompF2 5'- ATA GCC GCC CCC TCT CAA T -3', QompR2 5'- TCT ACT AAA ACT TCT GGG TGG TTG ACT -3', QompP2 5'- AGT CAA AGA CAT ACA AAG C -3', QISF1 5'- CAC CAA TGG TGG CCA ATT TAA -3', QISR1 5'- AAA GAA AGC GGT TGC ATT CG -3', QISP1 5'- ATA TCC GGC ATC ACG A -3', QISF2 5'- GCG AGC GTG GGT GAC ATT -3', QISR2 5'- ACC CAA TAA ACG CCG ACA AC -3', QompP2 5'- ATC AAT TTC ATC GTT CCC GG -3'である。

### 2. Real Time PCR

反応は, ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いて, TaqMan Universal Master Mix (2x) (Applied Biosystems) 12.5  $\mu$ l, プライマー各 900nM, Taq Man MGB プローブ 250nM, サンプル DNA10ng $\mu$ lを含む計 25  $\mu$ lの反応液で, 50 $^{\circ}$ C2 分の UNG 活性化反応, 95 $^{\circ}$ C10 分の TaqGold 活性化および UNG 不活化反応のあと, 95 $^{\circ}$ C15 秒および 60 度 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行った。

### 3. 検出法の感度の検討

感度の検討には、*C.burnetii* NM2 相菌ホルマリン不活化死菌(以下2相菌)を用いた。2相菌の培養および精製は定法にしたがって行った。菌数の測定は、2相菌を10倍段階希釈して、各希釈の10 $\mu$ lを直径5mmのマルチウエルプレートの上ウエルにのせ、乾燥および固定後、定法にしたがって蛍光染色し、10 $\mu$ l中の菌数を計測した。

計測した既知の濃度(菌数)の2相菌を段階希釈して、各PCR反応に100, 10, 1, 0.1, 0.01個の菌が含まれるように調整して感度の検討を行った。

## C. 結果

### 感度の比較

			検出可能な菌数				
			100	10	1	0.1	0.01
Omp1RT	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
Omp2RT	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
IS1RT	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	+
		2回目	+	+	+	+	-
IS2RT	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	+	-
com12-34	nested PCR	1回目	+	+	+	-	-
		2回目	+	+	+	-	-

以上のように、今回設計したIS遺伝子に対するプライマーおよびプローブ IS1RTが最も感度が高く、0.01~0.1個の菌が検出可能であった。IS2RTに関してもほぼ同等の感度が得られた。また、外膜蛋白質に対するプライマーおよびプローブ omp1RT および omp2RTは1~0.1個の菌が検出可能で、同じ遺伝子を標的とした nested PCRより感度が高かった。

## D. 考察

今回の結果から、新たに設計したプライマーおよびプローブによる Real Time PCR法は、通常の PCRより感度が高く、実用的であった。今後、他の細菌やゲノムに対する反応を解析し、特異性について検討する必要がある。また、実際の検出感度は、検体からの DNA抽出の高率に大きく左右されるので、それぞれの食品や関連製品に適し

た抽出法を検討する必要もある。

さらに、今回の解析から、Real Time PCR による検出法は、一度に多くの検体が処理および判定可能である反面、検体間のコンタミネーションの危険も大きいことが分かった。特に今回問題となったのは、ABI のシステムが遺伝子発現の解析を主に目的として作られている点で、病原体の検出用ではないことである。すなわち、①シングルチューブやキャップはなく、最低のユニットが 8 連チューブである。②8 連チューブを切り離して使うことも可能だが、キャップおよびチューブにはラベルが出来ず、操作が極めて煩雑になる。③チューブとキャップの間に固定用のプレートを挟まなければならない、サンプルのアプライがしにくいなどの点である。今後、検体間でのコンタミネーションを防ぐために、病原体検出に適した操作法および消耗品の改良を ABI にアピールしていくことや、別の Real Time PCR の機器を検討することも必要であると思われる。