

図 1 試験管内で発生させたニューキノロン耐性ペスト菌の *gyrA* 遺伝子の変異部位

A.

M1	ACCACCCGCATG <u>A</u> IGACAGCGCGGTCT	Gly to Asp at pos 81
M2	ACCACCCGCAT <u>T</u> GIGACAGCGCGGTCT	Gly to Cys at pos 81
M3	ACCACCCGCATGGTGACA <u>T</u> GCGGTCT	Ser to Ile at pos 83
M4	ACCACCCGCATGGTGACAG <u>A</u> GCGGTCT	Ser to Arg at pos 83
WT	ACCACCCGCATGGTGACAGCGCGGTCT	Wild Type

B.

<i>E. coli</i> 67	<u>ARVVG</u> DVIGKYI <u>PHG</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>A</u> VY <u>D</u> TIVRMAQPFLRYMI.V <u>D</u> <u>G</u> <u>Q</u> 106		
		Number Identified/Total	MIC in µg/ml
<i>Y. pestis</i> M1	<u>D</u>	37/65	4.10 (1.37)
M2	<u>C</u>	6/65	1.33 (0.44)
M3	<u>I</u>	11/65	1.31 (0.39)
M4	<u>R</u>	11/65	4.35 (1.09)

FIG. 1. Nucleotide sequence and protein changes in *Y. pestis* Cp^r mutants. (A) DNA sequences of wild-type (WT) *Y. pestis gyrA* and the four point mutants, identified as M1 through M4, corresponding to their designations in the text. Underlined nucleotides in the WT sequence denote the FRET assay probe 1. Nucleotide substitutions in mutants M1 through M4 are boldfaced and underlined. Amino acid substitutions and the position relative to *E. coli* GyrA (3) are given on the right. (B) Amino acid changes, isolation frequency, and CIP MIC for the various Cp^r mutants. Amino acid numbering (67 to 106) is relative to the *E. coli* GyrA sequence (3) and is indicated to the left and right of the sequence. Boldfaced, underlined letters indicate amino acid changes in the QRDR of *E. coli* GyrA that have been shown to result in Cp^r. MICs for the *Y. pestis* mutants determined by duplicate E Tests in five independent experiments are shown as averages with standard deviations in parentheses. Amino acid changes for mutants M1 through M4 are shown as boldfaced letters below the corresponding positions in the *E. coli* QRDR.

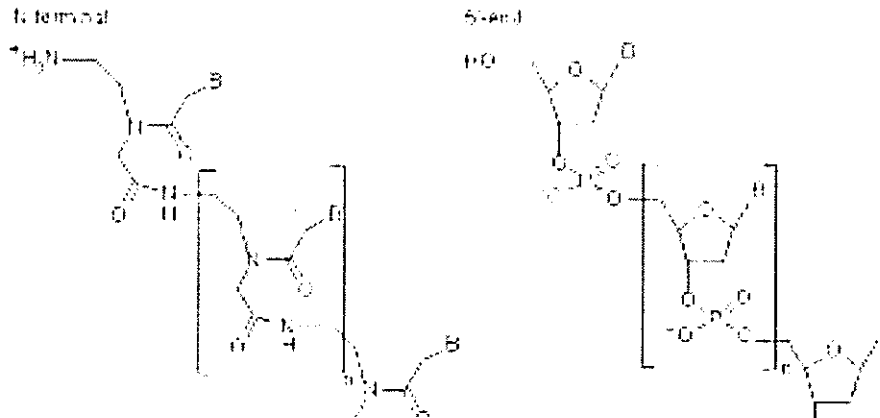
Lindler *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3649-3655, 2004. より抜粋

図2 PNA の構造と特徴

PNA

@PNA は DNA 類似の構造をもつ非天然の化合物

@リン酸結合ではなくペプチド結合で骨格を形成している事よりペプチド核酸と呼ばれる



<PNA の特徴>

1. 相補的配列を有する DNA および RNA 鎖に塩基配列特異的に強く結合する。
2. 低いイオン強度においても強くハイブリダイズが可能
3. 塩基配列の選択性が高い。

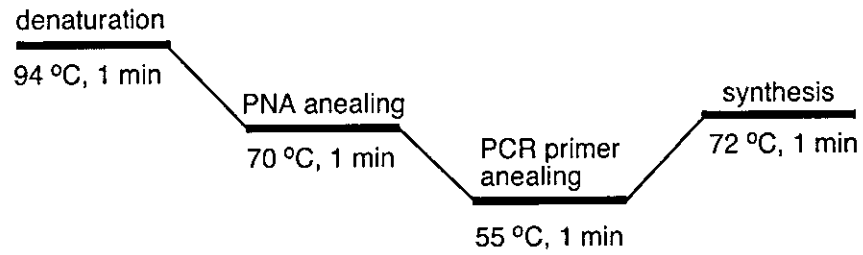
ミスマッチにより生ずる Tm 値の差	
Duplex	Tm の減少量
PNA/DNA	8~21°C
DNA/DNA	4~16°C



Tm 値の差が大きい事より DNA よりも塩基配列選択性が高く、1塩基置換が検出可能

図3 PCR clamping 法

<PCR 条件>



<PCR clamping 法の理屈>

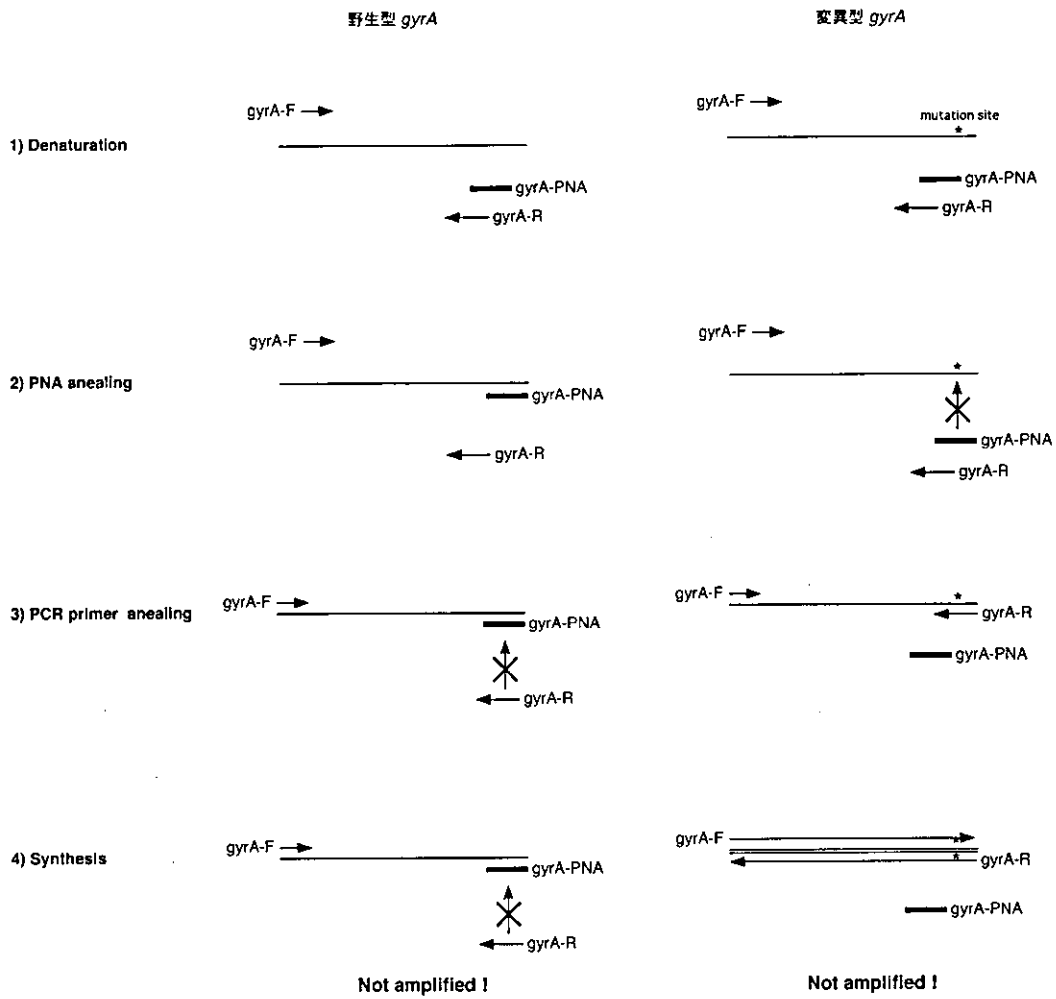
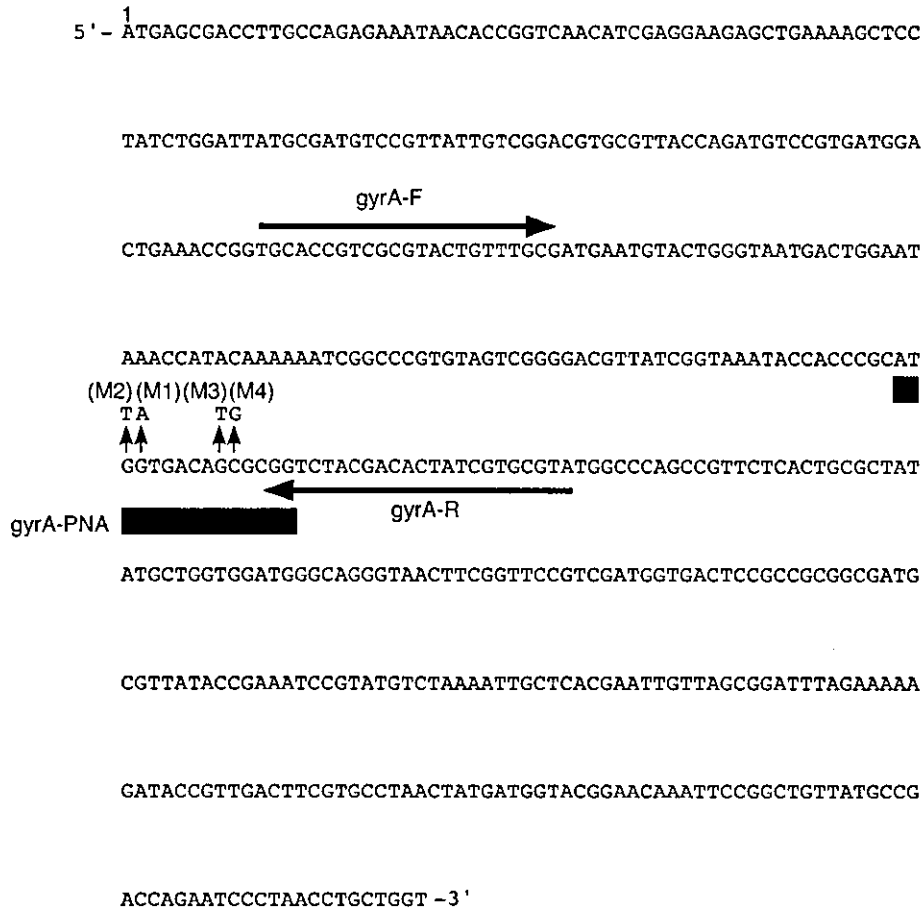
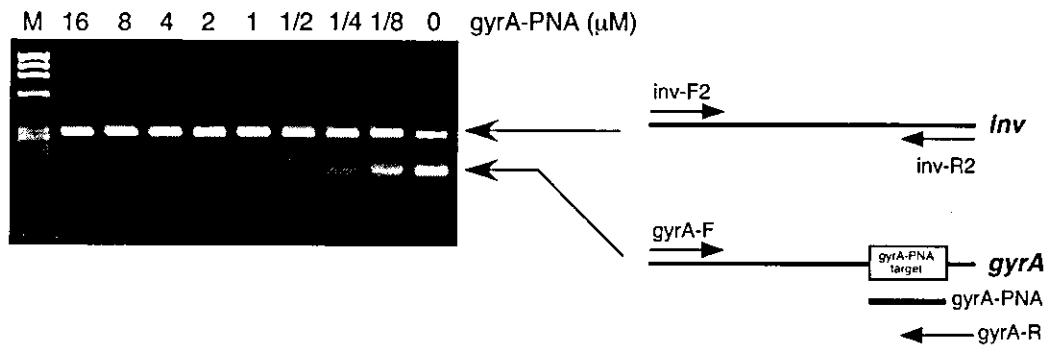


図4 *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (QRDR)の塩基配列とプライマー、キノロン耐性菌の変異導入部位



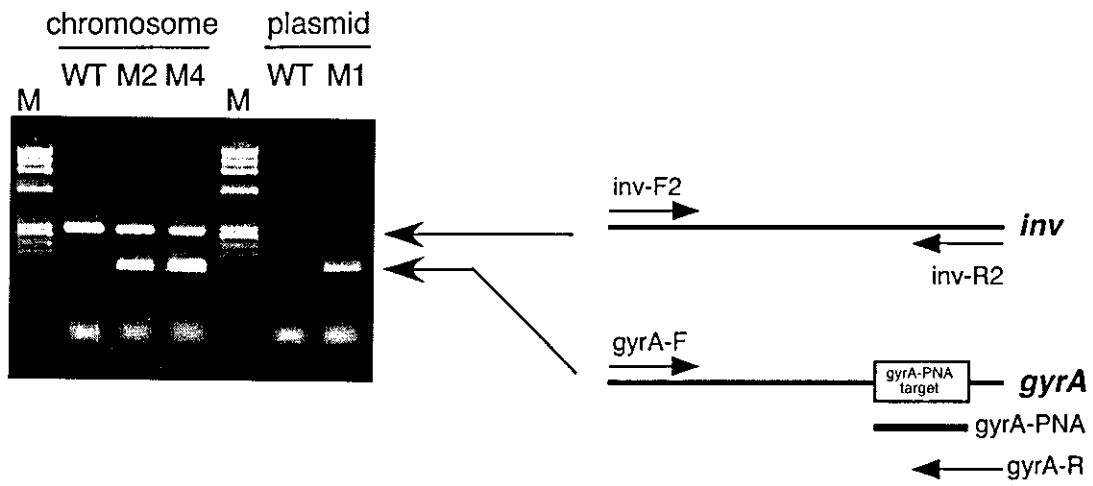
5'の1はDNA gyraseの開始コドンから示してあることを意味する。

図5 PNA-*gyrA* 濃度の最適化



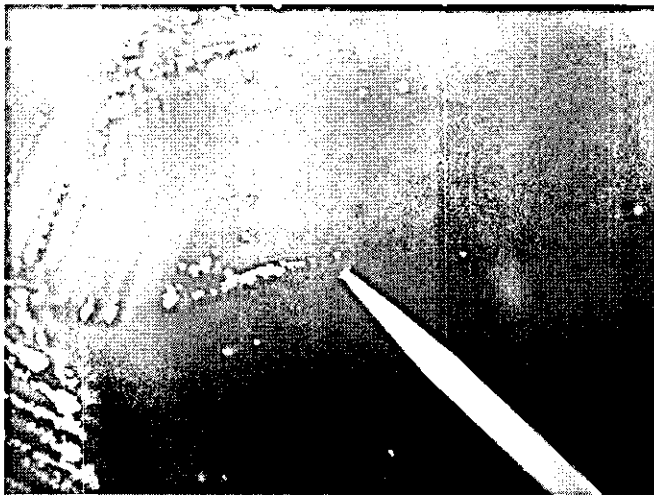
1 μM の濃度ではほぼ 100%野生型 *gyrA* 遺伝子の増幅を阻害し、それは *gyrA* 遺伝子に特異的である。

図 6 PNA-gyrA の鋳型選択性



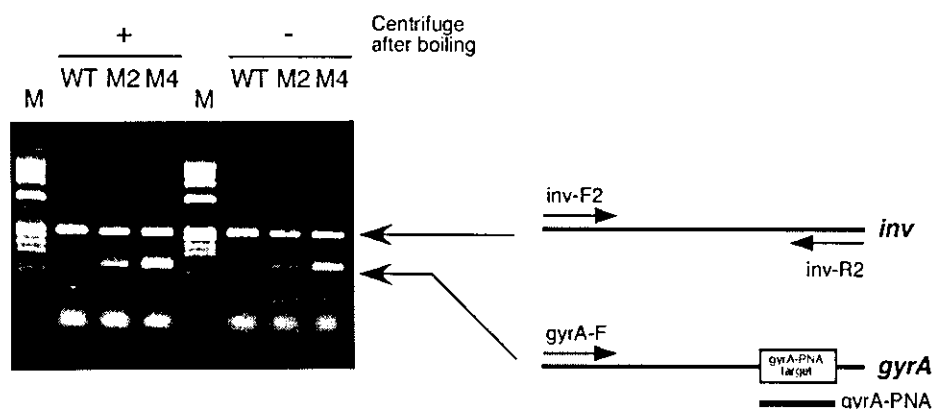
M1、M2、M4 変異 *gyrA* 遺伝子を増幅させており、野生型 *gyrA* 遺伝子の増幅のみを阻害して正確な塩基配列選択性を示す。

図 7 釣菌の実際



滅菌楊枝は一般的に用いられているものと同様のものを使用した。

図 8 粗抽出液 DNA を鋳型とした場合の PCR clamping 法の有効性



粗抽出液を用いた場合では遠心処理による細菌の残骸を除去しなくても有効に変異型 *gyrA* 遺伝子を検出した。

4. Real time-LightCycler polymerase chain reaction 法による サル痘ウイルス感染症の診断法の開発

分担研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)

協力研究者 西條 政幸 (国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)
福士 秀悦 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室研究員)
水谷 哲也 (国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)
緒方もも子 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室研究員)

研究要旨 近年、生物兵器のひとつとして痘そう (いわゆる、天然痘) ウイルスが用いられるという危険性が高まっていると考えられ、我が国においても、その危険性に対する備えの一環として、痘そうワクチンが再生産され、備蓄されている。天然痘は病原性の極めて高いウイルスのひとつであるが、ヒトに天然痘と類似の感染症を引き起こすサル痘ウイルスがある。サル痘ウイルスが存在する地域はアフリカ中西部で、ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症 (いわゆるヒトサル痘) は同地域における風土病であった。しかし、2003年にアフリカ (ガーナ) から米国に輸出された動物が感染源となるヒトサル痘が米国で流行した。ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症は、臨床症状から天然痘との鑑別は困難である。本研究では、サル痘ウイルスの A-type inclusion 遺伝子における特異的塩基配列を利用した、real-time LightCycler polymerase chain reaction による高感度サル痘ウイルス遺伝子検出法を開発した。当研究室で開発されている痘そうウイルス遺伝子を特異的に検出する real-time LightCycler polymerase chain reaction と併せて用いることにより、鑑別の困難な天然痘とヒトサル痘の迅速診断が可能となる。

A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性はかねてから指摘されていたが、2001年9月11日のニューヨーク市とワシントン DC でのテロ事件およびその後の炭疽菌によるバイオテロリズム事件で、現実のものになった。バイオテロリズムに用いられる病原体には、炭疽菌や痘そうウイルスなどの他に、エボラウイルスなどの出血熱ウイルスが含まれる。中でも痘そうウイルスが用いられるバイオテロリズムが発生した場合には、痘そうウイルスのヒトからヒトへの感染性、その病原性の高さから、その被害は甚大なものとなることも予想される。これまで本研究班の助成による研究で、痘そうウイルス遺伝子の特異的に検出する real-time LightCycler polymerase chain reaction (以下、LC-PCR) 法を

開発した (本研究班の H15 年度報告書)。

一方、天然痘が根絶された今日でも、天然痘様疾患がアフリカ中西部の地域で流行し、痘そうウイルスと同じポックスウイルス科オルソポックス属に分類されるサル痘ウイルスによることが明らかにされ、ヒトサル痘と呼ばれている。サル痘ウイルスの宿主はリスなどのげっ歯類である。2003年に西アフリカのガーナから米国にペット用として輸出されたげっ歯類 (Gambian Giant Rat など) が感染源となるヒトサル痘が米国で発生した。さらにガーナから米国に輸出されたげっ歯類の一部が我が国にも輸出されていたことが明らかにされている。我が国においても、ヒトサル痘の発生する可能性がある。そのため、将来、バイオテロリズムの結果として天然痘が発生した場合には、ヒトサ

ル痘の鑑別診断が重要になる。

本研究では、天然痘と臨床症状から鑑別の困難なヒトサル痘を迅速に、しかも、正確に診断するための、サル痘ウイルス A-type inclusion (ATI) 遺伝子における特異的塩基配列を利用した LC-PCR 法を開発した。

B. 研究方法

1) ウイルス：サル痘ウイルス Liberia 株、SEN-79 株、Zr-299 株など、国立感染症研究所に保管されているサル痘ウイルス 20 株を用いた。

2) PCR：サル痘ウイルス特異的遺伝子の増幅には、ATI 遺伝子を標的とした Gabon-1 (GAG AGA ATC TCT TGA TAT) と Gabon-2 (ATT CTA GAT TGT AAT C) によるプライマーセットを用い、PCR 反応が 30 回の [94°C、1 分/36°C、1 分/72°C、1 分] の条件による PCR 法によった。

3) サル痘ウイルスの部分 ATI 遺伝子の塩基配列の決定：ATI 遺伝子を標的とした ATI-up-1 (AAT ACA AGG AGG ATC T) と ATI-low-1 (CTT AAC TTT TTC TTT CTC) によるプライマーセットを用い、PCR 反応が 25 回の [94°C、1 分/50°C、1 分/72°C、1 分] の条件で得られた遺伝子増幅産物の塩基配列を、ダイレクトシーケンシング法で決定した。

4) LC-PCR：Forward プライマーには 5'-GAG ATT AGC AGA CTC CAA-3' を、LCRed プローブとして 5'-LCRed640-CTA GAT TGT AAT CTC TGT AGC ATT TCC ACG GC-3'-phosphorylation を、FC プローブとして 5'-GCA GTC GTT CAA CTG TAT TTC AAG ATC TGA GAT-3'-Fluorescein を、reverse プライマーとして 5'-TCT CTT TTC CAT ATC AGC-3' (reverse) または 5'-GAT TCA ATT TCC AGT TTG TAC-3' (reverse1) を用いた (図 2)。Reverse プライマーに二種類のプライマーを用いる目的は、サル痘ウイルスの ATI 遺伝子の塩基配列の特徴 (結果の項参照) からデザインされた。LC-PCR は、LightCycler-PCR (Roche Diagnostics 社、Mannheim、ドイツ) を用いて行われた。尚、Viral Nucleic Acid Kit™ (Roche Diagnostics) を

用いて、サンプルからウイルス遺伝子が抽出された。遺伝子検出感度を決定するための standard 遺伝子には、濃度が決定されているサル痘ウイルス Liberia 株の部分 ATI 遺伝子が挿入された pGEM-T-easy ベクターまたは Zr-299 株の部分 ATI 遺伝子が挿入された pGEM-T-easy ベクターを用いた。

5) 臨床検体：サル痘ウイルス Zr-299 株を感染させたサルから感染後 8 日目に採取された血液を用いた。

C. 結果

1) サル痘ウイルスATI遺伝子の塩基配列：国立感染症研究所に保管されているサル痘ウイルスの部分ATI遺伝子をATI-up-1 (AAT ACA AGG AGG ATC T) とATI-low-1 (CTT AAC TTT TTC TTT CTC) によるプライマーセットを用いたPCR法で増幅し塩基配列を決定したところ、1521bpからなる遺伝子が増幅される株と1068bpからなる遺伝子が増幅される株の2種類に大別された。MPX (Gabon) ATI-gene (GenBank MVU84504)における2147番目と2148番目の間に453塩基からなる遺伝子が挿入されている株 (1521bpからなる遺伝子が増幅される株) と欠損している株 (1068bpからなる遺伝子が増幅される株) に大別された (図2)。調べられたすべての株には、図1に示されているサル痘ウイルスATI遺伝子に特徴的な8塩基欠損が認められた。

2) Reverseプライマーとして 5'-TCTCTTTTCCATATCAGC-3' (reverse) を選択したLC-PCR：Reverseプライマーとして 5'-TCTCTTTTCCATATCAGC-3' (reverse) を選択したLC-PCR では、ATI遺伝子に453塩基の欠損のあるタイプのサル痘ウイルスを高感度に検出し、欠損のないタイプのサル痘ウイルスはそれに比較して低い感度で検出された (図4)。

3) Reverseプライマーとして 5'-GATTCAATTTCCAGTTTGTAC-3' (reverse1) を用いたLC-PCR：このLC-PCR法により、ATI遺伝子に453塩基の欠損のあるタイプのサル痘ウイルスに分類されるサル痘ウイルスZr-299

株感染サル感染後8日目に採取された血液からサル痘ウイルス遺伝子が増幅された (図5)。

4) LC-PCRとPCRの感度の比較: Reverseプライマーとして5'-TCTCTTTTCCATATCAGC-3'

(reverse)を選択したLC-PCRとGabon-1/

Gabon-2をプライマーとしたPCR法の検出感度を、サル痘ウイルスLiberia株DNAを用いて比較した。LC-PCR法では約20コピーのサル痘ウイルス遺伝子を検出可能であったが、PCR法によるサル痘ウイルス遺伝子検出はLC-PCRに比較して1000倍感度が低かった (図6)。

D. 考 察

サル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出するために、今回開発したLC-PCRにおいて用いたLCRed プローブ (5'-LCRed640-CTA GAT TGT AAT CTC TGT AGC ATT TCC ACG GC-3'-phosphorylation) が、サル痘ウイルスATI遺伝子に特異的に認められる8塩基欠損部位を含む塩基配列にアニールするようにデザインされている。調べられたすべてのサル痘ウイルスのATI遺伝子に、この塩基欠損が認められたことは、このシステムによりサル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出することが可能であることを示唆する。しかし、そのLCRedプローブがアニールする部位のすぐ下流に、453bpからなる塩基配列の欠損があるタイプとないタイプのサル痘ウイルスが存在した。そのためreverseプライマーとして2種類のプライマーをデザインすることが必要であった。サル痘ウイルス遺伝子のLC-PCRによる検出には、2種類のreverseプライマーを用いる必要がある。今回開発されたLC-PCRにおいては、LCRed プローブに特異的8塩基欠損の特徴をデザインしたが、reverseプライマーにそれをデザインすることで、2種類のプライマーセットを用いたLC-PCRを行なわなくてもすべてのサル痘ウイルス遺伝子を特異的に検出できる可能性がある。

これまでに私たちは、痘そうウイルスを高感度に検出するためのLC-PCRを開発 (昨年度の本研究班報告書に報告済み) してきたが、今回開発されたサル痘ウイルス遺伝子を高感度に

検出するLC-PCRと併用することによって、痘そうおよびヒトサル痘の診断が、より迅速かつ正確に行なうことができると考えられる。

今回の成績から、Gabon-1/Gabon-2をプライマーとしたPCR法の遺伝子検出感度は比較的低いと考えられた。実際の診断におけるPCRの診断における有用は、今後、評価されるべきである。なぜなら、サル痘ウイルスZr-299株感染サルから得られた血液は、LC-PCRでは陽性を呈したものの、PCR法では陰性を呈したからである (未公表)。

本研究によりサル痘ウイルス感染症の診断のためのサル痘ウイルス遺伝子を高感度に検出するためのLC-PCRを開発し、その診断における有用性を示された。しかし、ウイルス分離や電子顕微鏡、そしてウイルス抗原の特定による天然痘またはヒトサル痘の診断には重要であることは、論を待たない。

E. 結 論

サル痘ウイルス感染症の診断のためのサル痘ウイルス遺伝子を高感度に、かつ、特異的に検出するためのLC-PCRを開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. Vaccine, 2005. (in press)
- 2) Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S. (2005): Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked

- immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J Virol Methods* (in press)
- 3) Saijo, M., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Sata, T., Kurata, T., and Morikawa, S. (2005): Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Virol.* (in press)
 - 4) Hatakeyama, S., Moriya, K., Saijo, M., Morisawa, Y., Kurane, I., Koike, K., Kimura, S., and Morikawa, S. (2005): Persisting humoral antiviral immunity among the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, in press.
 - 5) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57.
 - 6) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149. 1279-92.
 - 7) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1228-1234.
 - 8) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
 - 9) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 5;577(1-2):187-92.
 - 10) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. (2004): A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol* 16(10): 1423-30.
 - 11) Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y, Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M, Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T. (2004): Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol* 149(6): 1139-1154.
 - 12) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75:295-299
 - 13) 森川 茂 (2004): ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20
 - 14) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人 (2004): SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5:35-42.
 - 15) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の事典、朝倉書店、pp107-109
 - 16) 森川 茂 (2004): ラッサ熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp91-92
 - 17) 森川 茂 (2004): 南米型出血熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp92-93
 - 18) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、家庭医学大全科、法研、pp2770

- 19) 森川 茂 (2004): リンパ球性脈絡髄膜炎、共通感染症ハンドブック、日本獣医師会、pp230-231
- 20) 森川 茂 (2004): マールブルグ病、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp78-79
- 21) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp144-145
- 22) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp128-129
- 23) 森川 茂 (2004): サル痘、新興再興感染症—SARS の教訓 [からだの科学 (増刊)] 日本評論社、pp188-191
- 24) 森川 茂 (2004): 天然痘ワクチンの復活 小児科臨床 (特大号/ワクチンのすべて) 67: 11
- 25) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. (2004) クリミア・コンゴ出血熱. ウイルス 54:223-228.
2. 学会発表
- 1) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. Research activities towards the control of viral hemorrhagic fever (University of Hokkaido). June 2004, Sapporo
- 3) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea
- 4) 西條政幸. 母親から感染したと考えられる クリミア・コンゴ出血熱の 4 歳女児例. 第 36 回日本小児感染症学会, 2004 年 11 月, 東京
- 5) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 6) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 7) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 8) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎. 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 9) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8 株痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 11) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイ

- ルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 12) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第27回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸
- 13) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expression mouse ACE2. 第27回日本分子生物学会年会. 2004年12月, 神戸
- 14) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Joint Panels Symposium on Vector-Borne Infectious Diseases and Control. December 2004, Kyoto
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特許取得: 該当なし

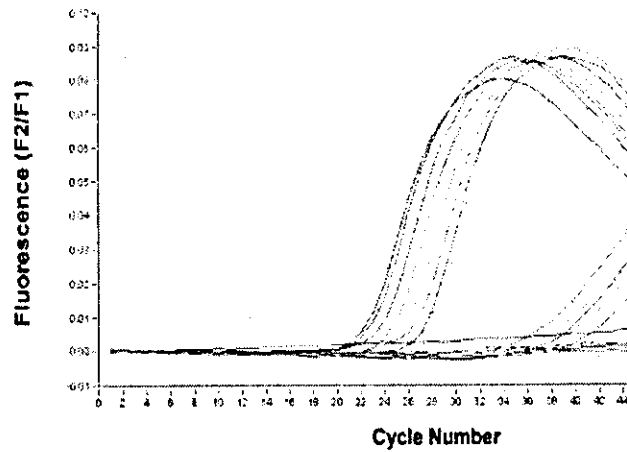


図 4. Reverse プライマーとして 5'-GATTCAATTTCCAGTTTGTAC-3' (reverse1) を用いた LC-PCR によるサル痘ウイルス遺伝子の検出。

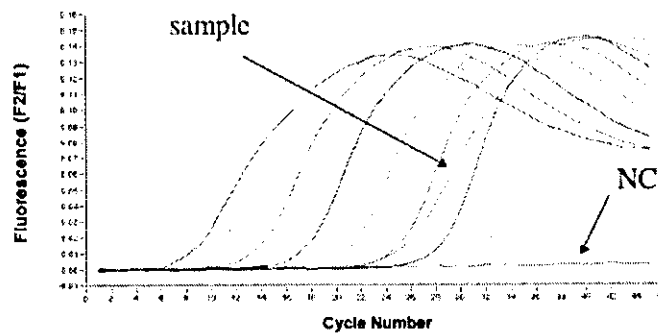


図 5. Reverse プライマーとして 5'-GATTCAATTTCCAGTTTGTAC-3' (reverse1) を用いた LC-PCR. "Sample"は、感染サルから得られた血液サンプルを示し、NC は陰性コントロールを示す。それ以外はスタンダードを示す。

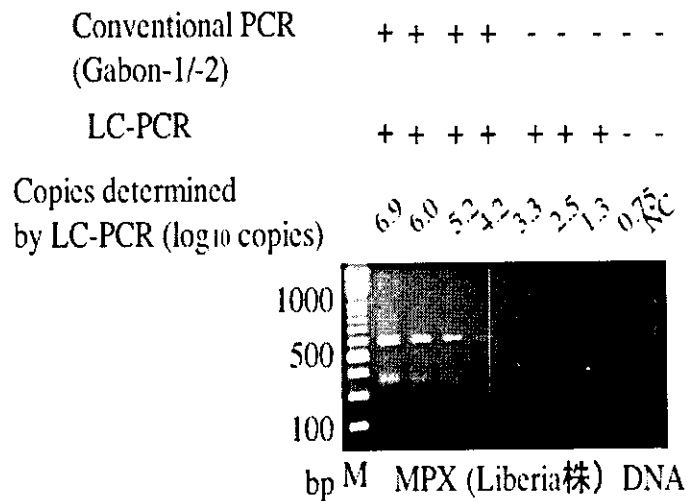


図 6. LC-PCR と PCR の感度の比較。

5. ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究

分担研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 小崎 俊司、幸田 知子（大阪府立大学農学部獣医学講座）
大隈 邦夫、諸熊 一則、中西 喜彦（化血研第一製造部）
岩城 正昭、福田 靖、小宮 貴子（国立感染症研究所細菌第二部）

研究要旨 ボツリヌス毒素による細菌テロを想定して、特定の対象者への予防を目的とした試作トキシイドを作出する。ボツリヌス A,B,E 及び F 型各菌を各々培養後、産生した毒素の精製を行い、最終的に多価（4 型混合）トキシイドとして約 500 用量相当の標品を得た。各型毒素ともに高度に精製し、過去に製造されたトキシイドに用いた毒素純度に比べて、安定且つ基本分子構造である M 型毒素標品を得た。各毒素は、個々にホルマリンで無毒化し、4 型混合トキシイドとして製剤中である。今後、安全性と有効性の評価は、実験動物を用いて確認する。

A. 研究目的

ボツリヌス毒素は、バイオテロに用いられる可能性の高い重要疾患として米国 CDC が疾病分類している 4 つのカテゴリーのなかでは、公衆衛生上最優先で対応が必要とされるカテゴリー A に属している。ボツリヌス毒素は極めて高い致死性を有し、毒素のみならず、ボツリヌス菌を食品等の生活基盤の環境物に混入させるバイオテロも予想される。これにより社会をパニックに陥れる可能性が高い生物兵器とも言える。細菌毒素性疾患の代表である破傷風、ジフテリアの予防には、毒素を不活化したトキシイドワクチンが導入され病気の征圧に貢献している。ボツリヌス毒素によるバイオテロの事前対応手段として、ヒトに感受性の高い A,B,E および F 型毒素に対応するトキシイドを試作製造し、テロ発生時の初動調査等に関する担当者を必要に応じて免疫することを可能とする手段を講じる。

B. 研究方法

ボツリヌス毒素に対するヒトの予防を目的とし、ヒトに感受性の高い A, B, E 及び F 型毒素に対するトキシイドワクチンの試作製造し、緊急時に初動捜査する担当者への免疫を可能とする事前対応策を検討する。今年度までに各 A,B,E 及び F 型菌を培養し、得られた毒素を精

製して得た毒素を材料として、トキシイドの調製を行った。ボツリヌストキシイドの無毒化、バルク調製、分注および小分け作業等の本生産は、当該ワクチンがヒトに用いるために、作業は「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」に定められた Good Manufacture Practice(GMP)管理区域内で行うこととした。なお、作製するトキシイドは、(1) ヒトに接種することを目的とした沈降多価（4 価：A,B,E 及び F 型）混合トキシイドを作製するとともに、(2) 今後作製するトキシイドの標準品として単味の沈降型トキシイドを作製する。なお、過去に国内で製造されたボツリヌストキシイドの力価試験は、モルモットに 3~4 用量を接種し、4 週後の血中抗毒素価をマウスによる中和抗体測定法で行われていたが、今回は、破傷風トキシイドの力価試験法に準じて、3~4 用量を免疫したマウスに毒素を直接攻撃して有効性を確認する試験法でも検討する。

（倫理面への配慮）

現時点ではヒト由来材料の使用やヒトを対象にした実験を予定しておらず、この項目に該当する事項はない。

また、実験動物の取り扱いに際しては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を

経て実験を行っている。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

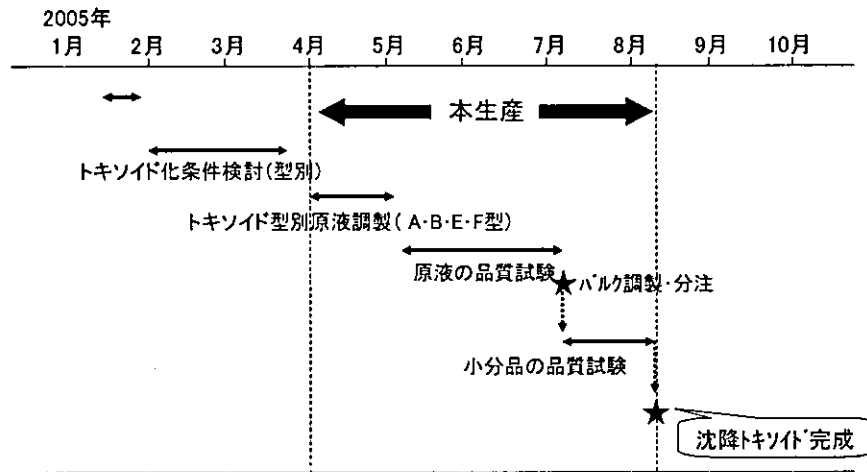
C. 研究結果および今後の方針

1) トキソイド化、バルク調製等

精製毒素の調製、無毒化等の作業を予定していた GMP 管理施設は、研究協力者の所属する機関の限られた GMP 施設を使用するに当たり、

当該施設の改修工事と他の作業との兼ね合いにより、今年度内にすべての製造工程を終了することはできなかった。今後の予定を含めた計画案を表1に示した。本年度内には、各型毒素の無毒化条件を検討した後、得られた数種のトキソイドをマウスに接種した後、毒素攻撃法による力価検定を行い、免疫原性の高い結果が得られたトキソイド条件で、本生産としてトキソイドを調製する。

表1. ボツリヌストキソイド作製スケジュール



各型のトキソイド原液は、1)ヒト免疫用として、沈降多価 (A,B,E 及び F 型) 混合トキソイドとして、蛋白質量 0.1mg、アルミニウム量 0.2 mg を含む水酸化アルミニウムゲルおよびチメロサル 0.001%の組成で、できあがり本数として 500 本分調製する。また、2)標準品用としては、各型単価の沈降トキソイドを 100 本分調製するために用いる (表 2)。

表2. ボツリヌス毒素のトキソイド化条件検討 (A, B, E 及び F 型)

(1) 使用毒素量	: 各 50 mg P
(2) トキソイド化条件	
1) 蛋白濃度	: 0.25, 0.5 mgPN/mL
2) ホルマリン濃度	: 0.2, 0.4 % W/V
3) 温度	: 35 °C
4) 期間	: 3 ~ 17 日
5) pH	: 6.2 ~ 6.4

2) ヒト接種用の沈降多価トキソイドの品質評価法

現在、製造販売されている破傷風及びジフテ

リアトキソイドの生物学的製剤基準の準拠した試験を実施する (表 3)。

表3. 2種類のボツリヌストキソイドの組成

1. ヒト用沈降トキソイド (多価): 500 本 (0.7mL/vial)	
蛋白質含量	: 0.1 mg/mL
アルミニウム含量	: 0.2 mgAL/mL
チメロサル含量	: 0.001%
2. 力価試験用標準トキソイド(単価[A, B, E 及び F 型]): 各 100 本 (1mL/vial)	
蛋白質含量	: 0.125 mg/mL
アルミニウム含量	: 0.2 mgAL/mL
チメロサル含量	: 0.001%

3) 標準品用の単価トキソイドの品質評価法

現在 WHO 等の国際機関においてボツリヌストキソイドの国際標準品は存在しない。そのために、米国で作製しているトキソイドと作製したトキソイドの評価が困難である。破傷風、ジフテリアトキソイドの力価は、国際標準品の単位に対する相対価として求めているために国際的な評価が可能である。従って、今回我々は A 単価、B 単価、E 単価及び F 単価の沈降ト

キソイドを作製し、それぞれの力価試験をマウス法で行う。今後、国内で作製されるヒト用の同型のトキシイドの力価測定量に参照となる「ものさし」として暫定的な力価を与える。

D. 考 察

米国でのボツリヌストキシイドの製造は、1960年代から行われ、Michigan Biologic Products InstituteではボツリヌスA,B,C,D及びE型毒素をホルマリンで無毒化したものがCDCを経由して、16,000人以上に投与されている。このトキシイドの有効性は実験動物を用いてA型毒素を噴霧した実験で確認された。ヒトでの実験はないが、噴霧または食物摂取にも効果が期待されている。このトキシイドの接種方法は、初回免疫として0.5mLを0,2及び12週に3回皮下接種する。3回接種後の血中抗毒素価は、83%の接種対象者は0.25単位を有し、1年後に実施する追加接種後では100%がこのレベルに達するという。上記トキシイドの実験動物での力価試験方法は明らかではないが、今回我々が作製するトキシイドの試験は、ジフテリア及び破傷風トキシイドの生物学的製剤基準の試験法である定量性の高い試験法を導入するため、精度の高い品質を保証することが可能となる。従って、実験動物の力価とヒト接種後の血中抗毒素価の定量により、トキシイドの評価基準を設定することが可能となる。また、これら方法で測定した値を付与した標準品を作製することにより、今後の作製されるトキシイドの評価を継続的、相対的にすることが期待される。

E. 結 論

ヒトに感受性の高いA,B,EおよびF型毒素に対応する4型(多価)トキシイドを試作製造するために、ジフテリア、破傷風などの細菌毒素に対する市販トキシイドの製造技術と知識を利用した。今後、試作トキシイドワクチンの品質管理方法を検討し、テロ発生時の初動調査等に関与する担当者が必要に応じて免疫することが可能かを検証する。将来大量かつ安定的に

トキシイドが作製されることにより、テロ発生時に現場で調査および処理に当たることが想定される担当者に対する予防措置が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 高橋元秀：ボツリヌス症. 感染症予防必携第2版, pp361-365 (編集者代表 山崎修道) (財)日本公衆衛生協会、2005.1.
- 2) 高橋元秀、岩城正昭、荒川宜親：ボツリヌス症. 感染症の診断・治療ガイドライン2004, pp.160-163 (監修；日本医師会感染症危機管理対策室および厚生労働省健康局結核感染症課) 2004.12.

提言

ボツリヌス毒素は、米国CDCのバイオテロに用いられる可能性が高い疾病4分類の中では公衆衛生上最優先で対応が必要とされるカテゴリ-Aに属している。従って、米国内ではCDC等の国家機関が協力して、ボツリヌストキシイドを米国FDAの認可承認外のワクチンとして製造している。このワクチンはテロ対策用の事前対応・予防策として、軍人又は研究者、検査担当者を対象として接種されている。海外から製造・認可承認されたトキシイドワクチンを国内に輸入することは困難であり、国策として防衛庁、厚生労働省、総務省等の省庁間での総括議論、調整が必要である。通常、破傷風、ジフテリアトキシイドを代表とするトキシイドワクチンの有効期間は2年間であり、今回試作製造したトキシイドは接種が推定されるボツリヌス毒素を取り扱う研究者等に対して約2年間を使用する程度を製造した。今後、国内でもボツリヌス毒素に対する予防ワクチンを超法規的に製造、接種を可能とする政策を樹立し、今回の試作トキシイドの技術を基盤とした大量のトキシイド製造法を確立し、特定の対象者に接種するための検討が必要であらう。

6. Q熱コクシエラの迅速検出法 ならびにオウム病クラミジアの迅速検出法の確立

分担研究者 岸本寿男 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 室長

研究協力者 安藤秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官
小川基彦 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官
柳 陳堅 国立感染症研究所 ウイルス第一部 流動研究員

研究要旨 バイオテロに利用される可能性がある病原体として挙げられているQ熱コクシエラとオウム病クラミジアの迅速検出法の検討を行った。いずれも TaqMan probe法を用いた Real-time PCR により、迅速、感度、特異性に優れた病原体検出法の開発を検討した。Q熱については今回設計した probe および primer、omp1 と IS1 は、*C.burnetii* の迅速検出法として優れた感度と特異性を有していた。また DNA 抽出法の検討を行い最適条件の設定を行った。大量の複数検体を短時間に処理可能な磁気ビーズを用いた DNA 抽出装置を従来法と比較検討し、有用性が認められた。またオウム病クラミジアの迅速検出法の検討については、動物由来クラミジアの迅速な病原体検出法として有用な方法を検討するため *C. psittaci* の 16s rRNA の領域において probe および primer を設計し、Real-time PCR を実施した。これまで検討した動物由来のクラミジアについては特異的な検出法としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

1. Q熱コクシエラの迅速検出法の検討

Coxiella burnetii (*C.burnetii*) はバイオテロに利用される可能性がある病原体として認識されており、迅速で確実な検出法とQ熱の迅速診断法の確立が急務である。我々は既に血清診断法の標準化と、病原体遺伝子の検出法の改良、標準化などを目指して検討を行ってきたが、本研究班に16年度から参加し、これまでの検討をさらに進めてバイオテロに対応可能な方法を検討することが求められた。*C.burnetii*がバイオテロに用いられた場合は、従来のQ熱の診断とは緊急性が異り、迅速かつ確実な診断と、同時に多数の結果が求められる。そこで本研究では特に患者検体や環境、食品等からの迅速な遺伝子検出系を確立することを目的とした。

2. オウム病クラミジアの迅速検出法の確立

オウム病の原因である *Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*) は、大量培養時はP3レベルにて扱うべき病原性の強い病原体で、比較的乾燥に強いことから、バイオテロにも使用される可能性

がある。*C. psittaci*は鳥類のみではなく、哺乳動物にも広く分布していることが知られているため、動物由来クラミジアの病原体検出法の開発は意義のあることであると考えられた。そこでTaqMan probe法を用いたReal-time PCRにより、迅速、感度、特異性に優れた動物由来クラミジアの病原体検出法の開発を検討した。

B. 研究方法

1. Q熱コクシエラの迅速検出法の検討

遺伝子検出法では、感染研編の病原体検出マニュアル等に示されている従来の nested-PCR 法があるが、抽出を含めて約2日の所要時間を要し、大量の検体の処理には不向きである。そこでさらに迅速で多検体の測定が可能な方法として TaqMan probe による Real Time PCR 法を利用した検出法の検討を行った。感度・特異性の検討と、実際の臨床検体や環境、食品からの検出法の検討として、まず遺伝子の抽出が最も困難と思われる鶏卵を用いて検討した。

材料と方法：

以下に詳細な方法を示した。

・ TaqMan 法による Real Time PCR 法

①TaqManMGB 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。

②Real Time PCR の実施条件

反応は、ABI PRISM 7000 および 7500 (Applied Biosystems) を用いて、TaqMan Universal Master Mix (2x) (Applied Biosystems) 12.5 μ l、プライマー各 900nM、Taq Man MGB プローブ 250nM、サンプル DNA 10ng 以上を含む計 25 μ l の反応液で、50°C 2 分の UNG 活性化反応、95°C 10 分の TaqGold 活性化および UNG 不活化反応のあと、95°C 15 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* Nine Mile 株 II 相菌ホルマリリン不活化死菌 (以下 II 相菌) を

用いた。II 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、II 相菌を 10 倍段階希釈して、各希釈の 10 μ l を直径 5mm のマルチウエルプレートのウエルにのせ、乾燥および固定後、定法にしたがって蛍光染色し、10 μ l 中の菌数を計測した。

計測した既知の濃度 (菌数) の II 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。

④特異性の検討

Acinetobacter baumannii、*Acinetobacter iwoffii*、*Alcaligenes faecalis*、*Alcaligenes xylosoxidans*、*Chryseobacterium indologenes*、*Escherichia coli*、*Flavobacterium breve*、*Flavobacterium odoratum*、*Haemophilus influenzae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Legionella pneumophila* (Serogroup1)、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas stutzeri*、*Serratia marcescens*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Listeria monocytogenes*、*Yersinia enterocolitica*、*Proteus vulgaris*、*Proteus penneri*、*Salmonella typhimurium*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella choleraesuis*、*Salmonella arizonae*、*Bacillus subtilis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis*、*C.pneumoniae*、*C.psittaci*、*Rickettsia japonica*、*R.conori*、*R.typhii*、*R.prowazekii*、*Ehrlichia chaffeensis*、*E.canis*、*HE*、*E.sennetsu*、*Orientia tsutsugamushi* の計 46 株に対する反応を検討した。

2. 鶏卵からの DNA 抽出法の検討

液卵を用いた予備実験で、卵白が混入すると DNA 抽出が困難であることが判明したため、以後卵黄からの抽出法を検討した。

①PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響

PBS 中の NaCl の濃度を (2.9~7.9%まで)

変え、卵黄へ等量加えたときの影響を調べた。また、PBS 中の Tween20 の濃度を (0.01~2.0%) 変え、同様に解析した。

②スパイク試験

スモールスケールとしては、卵黄約 500 μ l に 5.9%PBS-NaCl 750 μ l と *C.burnetti* (10~10⁵ 個/tube) を加え、ラージスケールとしては、卵黄 10ml に菌を 10²~10⁵ 個加えたものを用いた。

③DNA 抽出法の比較検討

これまで我々が検討してきたカラムを用いた抽出キット (QIAGEN QIAamp DNA mini) での方法に加え、磁気ビーズを用いた抽出装置による DNA 抽出法を検討した。詳細は以下のとおりである。

・カラム法と DNA 抽出機の抽出効率の比較検討

100 個から 0.1 個の精製菌を浮遊させた PBS10 μ L から DNA を抽出し、カラム抽出法と DNA 抽出機による抽出法の抽出効率を比較した。カラム法は、検討当初と同様に抽出キットの手順に準じて実施した。DNA 抽出機による抽出は、菌浮遊液 10 μ L を終濃度 1mg/mL の ProteinaseK を Lysis buffer (TOYOBO MagExtractor Genome) に追加したものを 850 μ L を加えてよく混和し、56 $^{\circ}$ C、2 時間可溶化した。続いて 96 $^{\circ}$ C、10 分加熱して、DNA 抽出機 (KingFisher mL, Thermo Electron Co.) による DNA 抽出に供した。DNA 抽出機の処理プログラムは、Thermo Electron Co. により試薬を TOYOBO MagExtractor Genome を用いた場合に最適化され、DNA 抽出機にあらかじめ登録されたプログラム時よって実施した。DNA 抽出液はいずれの方法においても 100 μ L に抽出し、その 5 μ L を Real Time PCR に供した。これは一反応あたり 50 個から 0.005 個の精製菌から抽出した DNA に当たる。

・*Coxiella* 菌をスパイクした卵黄からの抽出効率の比較検討

卵黄 500 μ L あたり 10 個から 10,000 個の菌

をスパイクし、各種抽出方法により抽出効率を比較検討した。昨年度のカラム法は、500 μ L の卵黄を 5.9%NaCl-PBS で前処理し、QIAGEN QIAamp DNA mini kit の手順に従っておこなった。また、同様の前処理を行った卵黄からのペレットを上記と同様に 1mg/mL の ProteinaseK を Lysis buffer (TOYOBO MagExtractor Genome) に追加したものを 850 μ L を加えて上記と同様に処理し、DNA 抽出機を用いて DNA の抽出を行った。J 法では、2g の卵黄に 0.1%Tween20-PBS を加えて低速、高速遠心によりペレットを回収する。そのペレットをさらに 1%NP40、1%Tween20、10mM Tris-HCl (pH8.0) を用いて混和、洗浄、ペレットの回収を行い、ProteinaseK を追加した Lysis buffer (TOYOBO MagExtractor Genome) に溶解。上記と同様に以後の抽出処理を行う方法である。ペレットが十分に小さくならない場合には NP40、Tween20、Tris-HCl 処理を追加している。ただし、J 法で用いた DNA 抽出機 KingFisher (Thermo Electron Co.) は抽出効率 99%、処理量 20 から 200 μ L、今回使用した機種 KingFisher mL は抽出効率 95%、処理量 50 から 1000 μ L と、仕様が異なるため、最終的に抽出されうるべき DNA 量が同量になるように 2.6mL の卵黄を抽出材料し、KingFisher mL に至適な 850 μ L の ProteinaseK を追加した Lysis buffer により卵黄ペレットを溶解させ、DNA 抽出機に供した。さらに J 法の再現試験と同様に 2.6mL の卵黄を NaCl-PBS 処理し、KingFisher mL による抽出も行った。

④市販鶏卵の Q 熱コクシエラ汚染調査

上記の方法で市販鶏卵を試供卵とし、卵黄 500 μ L を NaCl 前処理した後、TOYOBO MagExtractor Genome と KingFisher mL を用いて鋳型 DNA を抽出し、*C. burnetii* 遺伝子の検出を行った。Real Time PCR の内因性陽性コントロールは、同研究所細菌第一部の小泉博士より分与いただいた同じ反応条件で反応するレプトスピラのプライマー、プローブならびにレプトスピラ DNA を用いた。