

- Y, Sata T: Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. Colorado Springs, CO, USA, June 2005.
- 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S: Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. Colorado Springs, CO, USA, June 2005.
 - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S: Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. San Francisco, CA, USA, July 2005.
 - 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. San Francisco, CA, USA, July 2005.
 - 6) 西條政幸、網康至、永田典代、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（続報）。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005年11月
 - 7) 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コロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005年11月
 - 8) 福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂：VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005年11月
 - 9) 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、ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化。第53回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2005年11月
 - 10) 福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、森川茂：SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析。第28回日本分子生物学会年会（博多）2005年12月
- H. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）
特許取得：該当なし

3. ニパウイルス等人獣共通感染症に関する診断法の確立

分担研究者 山田 章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

協力研究者 加来義浩 (国立感染症研究所獣医科学部)

井上 智 (国立感染症研究所獣医科学部)

野口 章 (国立感染症研究所獣医科学部)

奥谷晶子 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究要旨 人獣共通感染症の病原体 (zoonotic agent) の中には、比較的容易に伝播され、発病率、致死率が高いなどの特徴をもち、発生時にパニックを誘発するなど、社会的な影響が大きいものも少なくない。2000年に米国 CDC が発表した "Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response" では、バイオテロリズムに使用される可能性のある病原体のリストを挙げているが、この中にも多くの zoonotic agent が含まれている。zoonotic agent を用いたバイオテロでは、感染地域が動物を介して二次的に拡大する恐れがある他、家畜に感染が広がった場合には、アグリテロとしてさらに被害が多様化・長期化する可能性がある。そのため、迅速診断法・治療法の開発などの発生時対策に加え、感受性動物を歩哨動物 (sentinel) としてサーベイランス機能を高めるなど、平時からの対策も重要になる。

本課題では、ヘニパウイルス感染症など、国内での診断体制が整備されていない人獣共通感染症を中心に、発生時・平時の両面に応用できる診断技術の開発・高度化を目的とする。

A. 研究目的

ニパウイルス (パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属 Nipah virus: NiV) 感染症は、1998年~99年にかけてマレーシア、シンガポールで初めて発生し、ヒトに致死的な急性脳炎、ブタに主に呼吸器感染症の流行をもたらした新興の人獣共通感染症である。この期間に両国合わせて 265 名の感染者、105 名の死亡者 (致死率 40%) が報告された。本ウイルスの自然宿主はオオコウモリであり、オオコウモリからブタに感染したウイルスが、その後ヒト、イヌ、ネコなどに伝播したと考えられている。マレーシアでは、感染拡大を防ぐため、約 110 万頭のブタが殺処分 (全国のブタの約 45%) され、1,800 カ所以上の養豚場が閉鎖 (全国の養豚場の約 48%) されたことにより、同国の養豚産業は壊滅的な打撃を受けた。

99年5月以降、本症の発生報告はなかったが、2004年の1~2月と3~4月にバングラデシュで二度の流行が報告された。1~2月の発生では感染者 23 名、死者 17 名、3~4月の発生では感染者 34 名、死者 26 名が報告され、致

死率はそれぞれ 74%、76%であった。これまでの調査では、流行にブタの関与は認められていないため、ニパウイルスがオオコウモリ→ヒトあるいはヒト→ヒトに直接伝播した可能性が指摘されている。

これまでに日本国内での自然発生および、海外からの輸入症例は報告されておらず、本症を疑う症例が出現した場合、迅速に原因病原体を特定するとともに、発生の疫学的背景によっては他の宿主動物における感染状況を調べる必要がある。本ウイルスは、先進諸国の研究施設では BSL4 病原体として取り扱われているが、わが国では BSL4 施設が稼動していない現状から、本研究では、感染性ウイルスを用いない診断法として、遺伝子検出系、血清検査系を整備することを目的とした。

B. 研究方法

1) ニパウイルス遺伝子の迅速検出系の確立

Taqman realtime PCR 法 (以下 Taqman PCR) および conventional PCR 法 (以下 conventional PCR) による NiV 遺伝子の迅速検出系を確立

するため、以下の材料、方法を用い、増幅効率の比較検討を行った。

鋳型 DNA として、NiV の N 蛋白遺伝子全領域をクローニングしたプラスミド NiV-N-pCl-neo を豪州家畜衛生研究所 (AAHL) より導入した。このプラスミドを 100 ng/μl に調製し、10 倍ずつ階段希釈したものをを用い、以下の条件で Taqman PCR と conventional PCR を行った。Taqman PCR については蛍光強度とサイクル数の相関 (amplification plot) により、conventional PCR については 1%アガロース電気泳動により、双方の反応効率を比較した。

[Taqman プロトコール]

Forward primer; NiV-N-1198F

Reverse primer; NiV-N-1297R

Taqman probe; Nipah-1247comp-FAM

50°C 2min→95°C 10min→(95°C 10sec + 60°C 1min)×45cycles

使用機器 : ABI 7500 realtime PCR system

上記の条件は、Pritchard et al. (International conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 2003 年 6 月) に拠った。

[conventional プロトコール]

Forward primer; NiV-N-1178F (Chua)

Reverse primer; NiV-N-1404R (Chua)

95°C 3min→ (95°C 30sec + 52°C 30sec + 72°C 1min)×30cycles→72°C 7min→4°C

使用機器 : ASTEC PC808

上記の条件は、Chua et al. Science 288, 1432-1435 (2000)を参考にした。

2) PCR primer および Taqman probe 配列と野外 NiV 分離株塩基配列との比較

今回用いた primer および Taqman probe は、1998~99 年のマレー半島における発生で、ヒト患者から分離された NiV の塩基配列に基づいて合成されたものである。これらの PCR 法の有効性を検討するため、他地域および他宿主

から分離された NiV の塩基配列と、上記 primer、Taqman probe 配列の比較を行った。下記に、比較に用いた NiV 株の由来、塩基配列の accession number (GenBank /EMBL/DDBJ) を示した。

地域	由来	Accession No.
マレーシア	ヒト	AF212302
マレーシア	ブタ	AJ627196
マレーシア	オコウモリ	AF376747
カンボジア	オコウモリ	AY858110
バングラデシュ	ヒト	AY988601

C. 研究結果

1) ニパウイルス遺伝子の迅速検出系の確立

Taqman PCR においては、amplification plot のグラフ上で、目視で指数関数的な増幅が認められる領域に threshold を設定し、Ct 値を算出した。Ct 値は鋳型 DNA 濃度依存的に上昇した (表 1)。蛍光値が threshold を越えた検体はプラスミド DNA 量 6.4×10^3 copy までであった。

表1 Taqman PCRとConventional PCRの比較

Plasmid DNA amount (copy number)	Taqman PCR (Ct value)	Conventional PCR (detection)
6.4×10^{11}	13.25	+
6.4×10^{10}	13.35	+
6.4×10^9	13.94	+
6.4×10^8	15.23	+
6.4×10^7	18.21	+
6.4×10^6	21.68	±
6.4×10^5	25.29	-
6.4×10^4	29.54	-
6.4×10^3	32.18	-
6.4×10^2	-	-

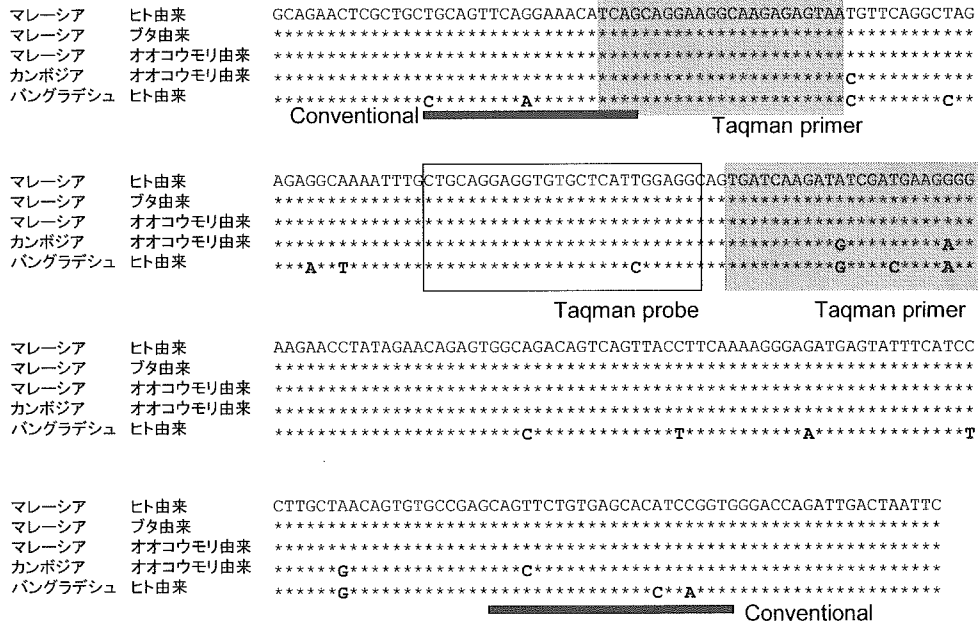
conventional PCR においては、産物 10 μl を 1%アガロースゲルで電気泳動したところ、プラスミド DNA 量が 6.4×10^7 copy までバンドを確認することができた (表 1)。

2) PCR primer および Taqman probe 配列と野外 NiV 分離株塩基配列との比較

前述の、マレーシア、バングラデシュ、カンボジアより分離された NiV (5 株) について、今回用いた PCR primer および Taqman probe を含む、N 蛋白遺伝子の塩基配列 (257 塩基；

列は同一であったが、カンボジアのオオコウモリ由来株、バングラデシュのヒト由来株では各 5、17 塩基ずつ変異が認められた。また conventional PCR 用および Taqman PCR 用

図1 NiV-N蛋白遺伝子の塩基配列の比較



AF212302 の nuc.1168-1424 に相当) をアライメントした (図 1)。この領域においては、マレーシアのヒト、ブタ、オオコウモリ由来株の配

列は同一であったが、カンボジアのオオコウモリ由来株、バングラデシュのヒト由来株では各 5、17 塩基ずつ変異が認められた。また conventional PCR 用および Taqman PCR 用

D. 考 察

本研究で用いた Taqman PCR 用 primer、probe および反応条件は、現在 AAHL で使用されているものである。AAHL では Ct 値 39 以下の検体を「陽性」と判定しており、この基準を適用すればプラスミド DNA 量 6.4×10^3 copy までが「陽性」と判断できた。これらの検体はいずれも、threshold 値の前後で指数関数的な増幅像が認められた。一方、conventional PCR においては 6.4×10^7 copy までが「陽性」と判定できたことから、検出感度において Taqman PCR は conventional PCR を 10,000 倍程度上回ることが確認された。一般的に Taqman PCR は conventional PCR よりも高感度であることが知られているが、primer および probe 配列が合致しない株が出現した場合、conventional PCR に比べ、新たな primer および probe 至適領域の探索、反応条件の検討などに時間がかかる。そのため、Taqman、conventional PCR の両方を、状

況に応じて使用する必要がある。

Taqman PCR 用 primer、probe および conventional PCR 用 primer の配列は、バングラデシュ、カンボジアより分離されたウイルス株の相当領域において、0~3 塩基の変異が確認された。しかし、Taqman probe 相当領域の変異は 1 塩基のみであり、いずれの primer 相当領域も少なくとも 3' 端の 10 塩基は保存されていた。

AAHL 等、BSL4 施設が稼動している研究施設においては、Taqman および conventional PCR は補助的なスクリーニングの 1 つとして行われており、最終的な診断はウイルス分離、ELISA、中和試験などの結果を総合してなされる。BSL4 施設が稼動していないわが国の現状では、相対的に PCR の重要度は高くなるため、さらなる感度・特異性の向上が望まれるが、同時に BSL3 以下で使用可能な複数の診断系の確立に向けた取り組みが必要と考えられる。

E. 結 論

NiV の N 蛋白遺伝子全領域をクローニングしたプラスミドを導入し、陽性対照として用いることで、感染研において Taqman PCR と conventional PCR による NiV 遺伝子の迅速検出が可能となった。今後、多様な変異をもつウイルス株の出現に対応できるよう、感度・特異性の向上を図ると同時に、複数の診断系の確立に取り組む必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

4. Q熱コクシエラの迅速診断法の確立

分担研究者 岸本 壽男 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室 室長

協力研究者 安藤秀二 (感染研・ウイルス第一部第五室・主任研究官)
小川基彦 (同・主任研究官)、柳 陳堅 (同・流動研究員)
佐藤 梢 (同・協力研究員)
百田隆祥 (栄研化学株式会社・生物化学研究所・研究員)
小島 禎 (同・課長)、池戸正成 (同・部長)

研究要旨 生物テロにQ熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*, *C.burnetii*) が用いられた場合の診断や検出では、従来のQ熱の診断とは緊急性が異なり、迅速に多数の結果が求められる。我々はこれまで患者検体や環境、食品等からの迅速な *C.burnetii* 遺伝子検出系と、Q熱が疑われる患者の血清診断法の確立を目的に、間接蛍光抗体法やウエスタンブロット法による血清診断技術を構築するとともに、PCR や nested PCR による迅速な遺伝子診断技術の開発を進めてきた。平成 17 年度は、*C.burnetii* が生物テロに使用される場合の可能性として、上水、環境水の汚染を想定し、これまでに検討した遺伝子抽出技術や遺伝子検出技術の応用の可能性を検討した。平成 17 年度は、容積の異なる蒸留水にホルマリン不活化した *C.burnetii* を各濃度でスパイクし、高速遠心による濃縮を行い、これまでに検討した市販の DNA 抽出試薬による抽出法と高感度な Real time PCR による検出効率を比較した。蒸留水により供試材料の容量が増えると、今回検討した 50 μ l では反応あたり菌体 0.1 個、50 ml (5000 倍容量) では反応あたり菌体 10 個と、抽出・検出効率が 100 倍低下した。このことから、今後供試検体のより効率的な濃縮法を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

生物テロの場合は従来のQ熱の診断とは緊急性が異なるため、迅速に多数の結果が求められる。特に患者検体や環境、食品等からの迅速な遺伝子検出系と、Q熱が疑われる患者の血清診断法を確立することを目的に、これまでに間接蛍光抗体法やウエスタンブロット法による血清診断技術を構築するとともに、PCR や nested PCR による迅速な遺伝子診断技術の開発を進めてきた。平成 17 年度は、生物テロに使用される場合の可能性として、上水、環境水の汚染を想定し、それらの材料からのこれまでの遺伝子診断技術にもとづく遺伝子抽出技術や遺伝子検出技術の応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

材料と方法：

1. *Coxiella* 菌株

粒子を計測した *C.burnetii* ホルマリン不活化精製 II 相死菌を効率比較試験に使用した。

2. DNA の抽出

1) 50ml の蒸留水に 10^0 から 10^4 の菌 (/100 μ l の PBS(-)) をスパイクした希釈系列を作製した。これらを 15,000 回転 1 時間遠心後、上清を捨て、仕様のとおり QIAamp DNA Mini キットに含まれる Lysis buffer と ProK (終濃度 1 mg/ml) を入れ、よく混和し、以下キットの方法に準じて DNA を抽出した。最終的に 50 μ l (1000 倍濃縮相当) に溶出し、その 5 μ l ($0.1 \sim 10^3$ /assay 相当) を Real time PCR に供試した。また、PBS 50 μ l に 1,000 個から 0.1 個の精製菌を浮遊させたものから DNA を抽出し、蒸留水での希釈と濃縮効率の比較検討を行った。

2) *C.burnetii* 特異遺伝子検出 Real time PCR :

これまでに構築した系のうち、最も感度ならびに特異性がよかった omp1 と IS2 のプライマー・プローブを用いた TaqMan Real time PCR により *C.burnetii* 特異遺伝子の検出を行った。

C. 研究結果

1. 高速遠心による濃縮効率の検討

蒸留水により供試材料の容量が増えると、今回検討した 50 μ l では反応あたり菌体 0.1 個、50ml (5000 倍容量) では反応あたり菌体 10 個と、抽出・検出効率が 100 倍低下した(表 1, 2)。

表 1. 50ml の蒸留水からの遺伝子検出

スパイク菌数/検体				
Coxiella particles/50mL				
10,000	1,000	100	10	1
Coxiella particles/assay				
1,000	100	10	1	0.1
+	+	±	-	-

表 2. 50 μ l からの遺伝子検出

検出可能な菌数(/assay)				
100	10	1	0.1	0.01
+	+	+	±	-

D. 考 察

生物テロに *C.burnetii* が使用される場合の可能性として、上水、環境水の汚染を想定し、それらの材料からの遺伝子検出技術の応用の可能性を検討した。

蒸留水により供試材料の容量が増えると、予想以上に低下した。このことから、今後供試検体のより効率的な濃縮法を検討する必要があると考えられた。しかし、また一方で、上水や環境水が汚染された際、人への感染・発症に必要な菌量のリスク評価が不十分なため、今回得られた検出感度の評価は実際には困難である。

今後、上水試験法で用いられている DEAE-cellulose 吸着・凝集法や、上水や環境水からのさまざまな病原体の検出のために用いられている Cellulose nitrate 膜、陰イオン膜、珪藻土、ポリエチレングリコール、ヒドロキシアパタイトなどの吸着剤を種々検討するとともに、より大容量の試料の処理法の検討が必要と考える。また、汚染された上水や環境水から

の人への感染リスクを評価する方法の検討と情報収集を行う予定である。

E. 結 論

生物テロとして *C.burnetii* が上水、環境水に混入された場合、それらの材料からの遺伝子検出には、従来よりさらに効率的な濃縮法を検討する必要があると考えられた。また、上水や環境水が汚染された際の、人への感染・発症に必要な菌量のリスク評価も必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) 岸本寿男、安藤秀二：リケッチア・クラミジア感染症. ネオエスカ・感染症・アレルギーと生態防御 (倉田毅編)、p.124-129、同文書院、2005.

2. 学会発表

- 1) Kishimoto T, Ando S, Ogawa M. Laboratory diagnosis and surveillance of Q fever in Japan. Japan-Taiwan Symposium on Zoonotic Diseases, Tokyo, September, 2005.
- 2) 安藤秀二、小川基彦、重松美加、岸本寿男、山本徳栄：国内のリケッチア感染症の現状 (2005 年). 第 23 回日本クラミジア研究会・第 12 回リケッチア研究会合同研究発表会 (東京) 平成 17 年 11 月
- 3) 山本徳栄、近真理奈、山口正則、小川雅也、前野直弘、東 久、深井正之、板屋民子、斉藤利和、木村 弘、安藤秀二、小川基彦、岸本寿男：埼玉県内のイヌ、ネコにおける *Coxiella* 属および *Rickettsia* 属に対する血清抗体価. 第 23 回日本クラミジア研究会・第 12 回リケッチア研究会合同研究発表会 (東京) 平成 17 年 11 月
- 4) 西城卓也、堀江典克、胡曉晨、伴信太郎、安藤秀二、古屋由美子、小川基彦、岸本寿男：慢性疲労を訴える患者における Q 熱リケッチア保菌の可能性に関する検討. 第 23 回日本クラミジア研究会・第 12 回リケッ

チア研究会合同研究発表会（東京）平成
17年11月

- 5) 安藤秀二、荒川香南子、小川基彦、柳陳堅、
佐藤 梢、藤田 修、堀田明豊、宇田晶彦、
棚林 清、岸本寿男：鶏卵からのQ熱コク
シエラ検出に関する研究（第2法）. 第23
回日本クラミジア研究会・第12回リケッ
チア研究会合同研究発表会（東京）平成
17年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

5. 感染組織からの *Naegleria fowleri* の迅速検出法の開発と動物感染モデルを用いた陽性対照標本の作製と供給

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所寄生動物部

協力研究者 泉山信司、八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）
中島典子（国立感染症研究所感染病理部）
高橋 均、林 森太郎（新潟大学脳研究所病理学分野）

研究要旨 自由生活性アメーバ類に起因する髄膜脳炎には *Naegleria fowleri* の感染に起因する原発性アメーバ性髄膜脳炎（Primary Amoebic Meningoencephalitis: PAM）と *Acanthamoeba* あるいは *Balamuthia* の感染に起因する肉芽腫性アメーバ性脳炎（Granulomatous amoebic encephalitis: GAE）の2型に大別される。前者は、鼻腔の嗅神経末端からアメーバが侵入し、嗅神経沿いに中枢神経へ到達し、感染から 5-10 日のうちに患者を死に至らしめる。わが国では極めてまれな疾病で、1996年に佐賀県で本アメーバに起因する原発性アメーバ性髄膜脳炎による死亡例が一例報告されているに過ぎない。*Naegleria fowleri* は従来、温水環境を好む自由生活性アメーバで、一旦温水環境が汚染されるとその場に定着して長期にわたりヒトへの感染の恐れが生じる。ひるがえって、わが国には温泉や入浴施設、あるいはその他の温水環境が数多く存在し、特に循環式浴槽が汚染された場合には本症の集団感染につながる恐れがある。後者の亜急性、慢性の肉芽腫性アメーバ性脳炎は免疫不全者における *Acanthamoeba* の日和見感染とされていたが、近年、健常者での *Balamuthia mandrillaris* による脳炎が報告され、わが国ではこれまでに 4 例のアメーバ性脳炎患者が知られている。しかしながら、*Balamuthia* の感染経路や病原巣などに関しては今後の検討に待たれる状況にある。当該研究ではバイオテロ関連病原体である *Naegleria fowleri* の患者の迅速病理診断法の開発を行った。

A. 研究目的

原虫・寄生虫を用いた生物テロの可能性は低いものの、温水環境に生息する自由生活性アメーバ類の中には極めて強い致死性の疾患の原因病原体、*Naegleria fowleri* が知られている。*N. fowleri* は病原性が強く、作為的に環境を汚染することで社会的混乱を引き起こす恐れがある。本アメーバ類は本来自由生活性であることから、環境が汚染されるとその場に定着・増殖するのみならず汚染の拡散が懸念される。わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の起病因病原体は *N. fowleri* に限らず、*B. mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. の報告があり、鑑別診断の必要性から本研究ではこれら 3 種類のアメーバを対象とした *in situ* hybridization 法の応用について検討した。

B. 研究方法

Naegleria fowleri オリゴプローブ :

Naeg1ish :

ACGAGCTTGTGGTGGCCACGACAGCTTTCGCCTTAGTTG

Naeg2ish :

GCACAACGATTTATTTACAGTTGCAACCCAAAGGGGCCTC

Naeg3ish :

CCAATGGCTGCTCTAAGGGTTATCTACACCCAAATCATGG

Naeg2ish プローブの位置を赤の枠で図示した。他のアメーバとの鑑別は重要となることから、*Acanthamoeba*、*Balamuthia*、ヒトの配列と相違が大きな領域を選択し、*Naegleria* 属検出プローブとした。領域の位置は、*N. fowleri* の 18S rRNA 領域の登録されている配列（AF338423）を基準として、860-899の間とした（図ではギャップの処理により数値が異なっている）。この領域は *Naegleria* 属に共通であることを他の登録配列より確認した。

```

          940          *          950          *          960          *          1000          *          1020
Nfowleri af3384 : TCGTCCACGTTTCATCCGGTSAAGGCGCTTTGGGCGAACTGTAAATAAATCGCTCGCTTAAAGCGGGCTATGATACTCTGCCAGAG
naegleria probe :
acanth18S probe :
Acas af251938 : CGTGCGGGGGTGGGTCCTTGGGCGAGATCGTTCGGTGAATAAATTAGAGCTTCBAAGCAGGCAGATCCCAATTTCTGCCACC
Balamuthia af01 : CTCGGGTGGGCGAGGCTGCGAGGCGGACCAATTAATTGAAAAAATTAGAGCTTCBAAGCAGGCAGATCCCAATTTCTGCCACC
human hsrnl8s : TCTTAGCTGAGTGTCCCGCGCGGCGAGACCGTTCATTTGAAAAAATTAGAGCTTCBAAGCAGGCAGGCGCCGAGC-----CGCCTG

```

Acanthamoeba オリゴプローブ :

Acanth2ish :

GGGTTTTGATGGACGGGTTAGCGGGCATATTTAGCAGGT

Acanth3ish :

TCTAAGAAGCACGGACGCCGAACCCCTACCGCCACAC
GGA

Balamuthia mandrillaris オリゴプローブ :

Bala2ish :

GCTCACCCCTGGTTTTGAATAGCAGGATTGGCATGACTA

Bala3ish :

AAGAAGTACTTCTACCAATCCAACCGCCAGAAGGCAA
GGG

Acanthamoeba と *Balamuthia* のプローブの位置

を赤の枠で図示した。領域は *Acanthamoeba* で

は *A. castellanii* の登録されている配列

(AF251938) を基準として 1733-1772、

Balamuthia では *B. mandrillaris* の登録配列

(AF019071) を基準として 1528-1567 を用いた。

各プローブの 5'側にはビオチン標識がなされ

ており、発色反応に際してはビオチンがアビジ

ンの標的となる。プローブは Diethyl

Pyrocarbonate 処理水に 1 pmol/μl となるよう希

釈し、分注して凍結保存した。

```

          1760          *          1780          *          1800          *          1820          *          1840
Nfowleri af3384 : GAGGGGTTAGTTTGTGGGACTGGCTTTAGCCCTGTTCCAAACCTACGTCGACTTTTGTGAGCTTCTTAAAGGACTTCATTCGTT
naegleria probe :
acanth18S probe :
Acas af251938 : TCGCGGCGACGTCATCCCGCGGCGGGCCGGGTCCTGTTGGGGGGTGGGTTCGGCGTCCGTCCTTCTAGAGGGGACTGCTGCG
Balamuthia af01 : TCCATCTTCGGGTTGGGTTGGGTTCCGTCGTCGCTTCCCTTGCCTTCGGGGTGGGATTGGTAGAGTACTTCTTAGAGGGGACTATCCG
human hsrnl8s : -----CGAGCGGTCCGGCTCCCCCAACTTCTTAGAGGGGCAAGTGGC

```

染色方法

1. 手順

1) 病理組織切片 :

組織切片をキシレン浸漬により脱パラフィンを行い、100%エタノール、次いでアセトンへ浸漬した後に結露を避けて風乾した。

2) ハイブリダイゼーション :

脱パラフィン後の切片をパイロジェンおよび RNase 除去精製水に 3 分程度浸漬して水とし、切片上に 300 μl のハイブリダイゼーション用緩衝液 (10%ホルムアミド、2 倍濃度標準食塩クエン酸緩衝液 (2×SSC、150mM NaCl、15mM Sodium Citrate)、Denhardt's 溶液 (和光純薬)、50 mM リン酸緩衝液、0.25 mM EDTA、0.5 mg tRNA (Roche)) を載せて 37°C 30 分間浸漬した。次いで、最終濃度 0.01 pmol のプローブとサケ精子由来の DNA 0.5 mg を含むハイブリダイゼーション溶液に置換し、カバーガラスをかけて 50°C、1 時間反応させた。反応後、カバーガラスを外し、TBS 溶液 (250 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl) ですすぎ、10 倍希釈した SSC 緩衝液中で 50°C、15 分の洗浄を 2 回行い、再び TBS 溶液で 3 分間程度浸漬した。

2. 発色

次に、内在性 Peroxidase の不活化処理のために、0.3% H₂O₂ メタノール液に室温で 30 分間浸漬した。TBS 溶液で洗浄後 (3 分間隔で 2 回)、TBS 溶液で 4 倍に希釈した BlockAce (雪印) に室温で 1 時間処理した。

TBS 溶液で洗浄後、GenPoint システム (DAKO) による発色を行った。具体的には、1,200 倍希釈の Primary streptavidin-HRP (peroxidase 標識ストレプトアビジン) 溶液 200 μl を切片上に載せ、室温で 15 分間反応させた後、TBST 緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6、0.3 M NaCl、0.1% Tween 20) で 3 分間隔で 3 回洗浄し、次いで切片上に Biotin-Tyramide を滴下し、室温で 15 分間反応させた。TBST 緩衝液で 3 回洗浄後、切片上に Secondary streptavidin-HRP を滴下し、室温で 15 分間反応させた。TBST 緩衝液で洗浄後、顕微鏡下で 200 倍希釈のジアミノベンチジン (DAB) を滴下し、3 分間程度発色させた。反応後、速やかに滅菌水に浸漬して反応を停止させ、ヘマトキシリンによる核染色を行って顕微鏡標本とした。

一部の試料については Peroxidase 発色法に

かえて Alexa488 標識アビジンで蛍光染色を行い、Evans Blue によりカウンター染色を行った。

C. 研究結果

1. 病理組織像

わが国で報告された *N. fowleri* 感染事例においては典型的な原発性髄膜脳炎 (PAM) の像が観察されており、その際の病変は脳底部の脳表側を主体とした分布であった。組織中に観察されるアメーバ栄養体は直径およそ $10\mu\text{m}$ と大きさが比較的揃うという特徴が認められた。また、*N. fowleri* の病理像の特徴として組織内に嚢子形成が認められないことも指摘されている。これに対し、*Balamuthia* あるいは *Acanthamoeba* 感染症では肉芽腫性脳炎の像を呈し、観察されるアメーバ栄養体は $12\mu\text{m}$ 以上と大きく、不揃いであった。これらのアメーバ感染では組織内に嚢子が確認されることが多い。

組織内アメーバの染色性には特徴があり、*N. fowleri* が PAS 陰性から弱陽性であるのに対し、*Acanthamoeba* や *Balamuthia* ではアメーバ細胞内に陽性顆粒が観察される。また、Bodian 染色では、*N. fowleri* が嗜銀性を示さないのに対して、*Acanthamoeba* および *Balamuthia* では細胞膜に線状の明らかな嗜銀性を示す。

2. In situ hybridization 法

当該研究において、in situ hybridization 法を用いて病理切片上の *Naegleria fowleri* (矢印) の鑑別診断法の開発を行った。その結果、分別染色が可能となり、標的アメーバの細胞内に強いシグナルが確認された (Fig. 1a & b)。当該研

究で用いた GenPoint システム (DAKO) の染色特性として、細胞質全体は比較的弱く茶褐色に染色され、部分的に強く点状に染まる傾向が示された。

また、本方法では発色方法を DAB - Peroxidase 反応から Alexa488 標識アビジン法に変更することで蛍光染色に切り替えることができ、病原体のスクリーニングに適しているとの感触を得た。その際、Evans Blue によるカウンター染色を行うことで補色対比による緑色の特異蛍光を強調することが可能であった (Fig. 2)。

Balamuthia mandrillaris はわが国のアメーバ性脳炎の主要な病原体として注目されるものであるが、未だにその感染経路が明らかとなっていない。したがって、生物テロに使用される可能性は低いものと考えられるが、*N. fowleri*

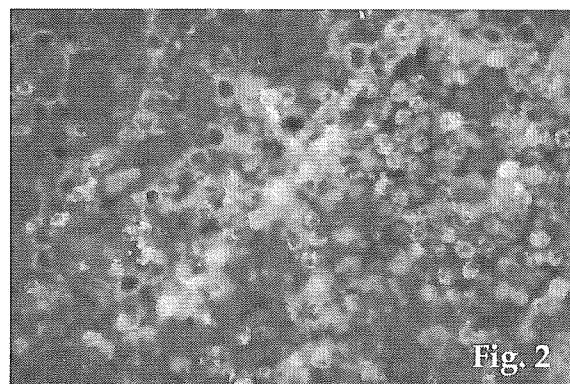


Fig. 2 病理切片上の *Naegleria fowleri* の FISH 染色像発色系に Alexa488 標識アビジンを用いることで、蛍光染色像の観察が可能となる。カウンター染色に Evans Blue を用いることで緑色の蛍光増を呈するアメーバをより鮮明に浮き立たせることができる。

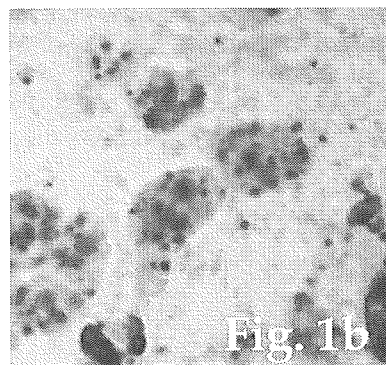
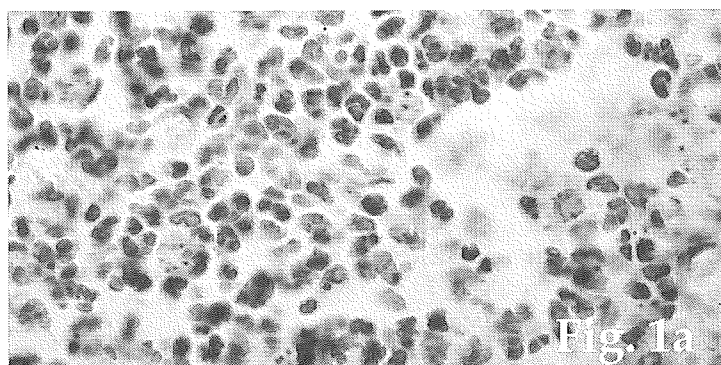


Fig. 1. 病理切片上の *Naegleria fowleri* の ISH 染色像。

- 組織内で増殖する *N. fowleri* (▶) に in situ hybridization 法による強いシグナルが得られた。
- 高倍率での観察では用いた試薬の特性からアメーバ内 (▶) は点状の染色像となる。

感染との鑑別診断には欠かせない対象である。Fig.3a, bは *B. mandrillaris* による感染脳病理切片の in situ hybridization 像である。Bala3ish をプローブとして用いた in situ hybridization によりアメーバ細胞内に陽性反応の強いシグナルが観察された。本方法では *B. mandrillaris* と *N. fowleri* の間に交差反応は示されなかった。一方、*B. mandrillaris* と *Acanthamoeba* との間では、反応条件を緩やかにすることで微弱な交差反応が観察された。したがって、*Balamuthia* を標的とした染色では、ハイブリダイズの反応条件を厳密にする必要がある。

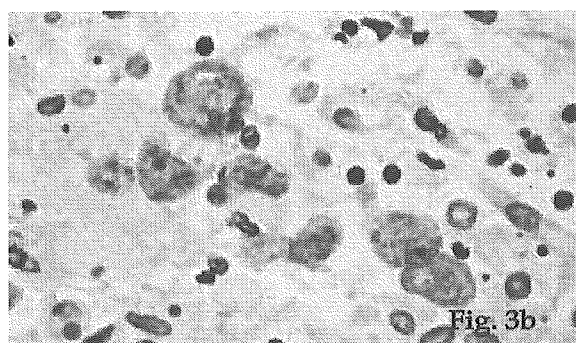
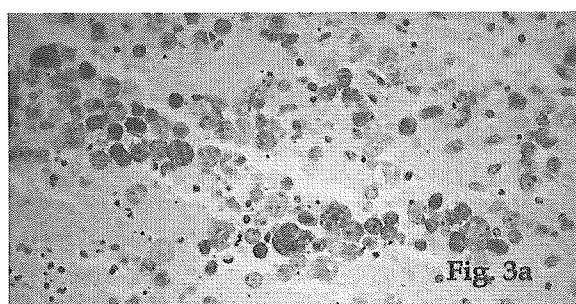


Fig. 3 In situ hybridization 法による病理切片上の *Balamuthia mandrillaris* 栄養体の染色像。

a. *Naegleria* の染色像と同様に、アメーバの細胞内に in situ hybridization 法による強い陽性シグナルが得られた。 *Balamuthia* は血管周囲に集中して見られることが多い。虫体の大きさはさまざま、 *Naegleria* の染色像とは明らかに異なる。

b. 強拡大像。ヘマトキシリンによる核のカウンター染色像において、栄養体が鮮明に観察される。

当該研究で用いたプローブはいずれも mRNA gene の一部領域を用いており、組織標本の染色に先立って3種類のアメーバの塗抹標本を陽性対照として交差反応性の検討を行った。それぞれのプローブの交差反応を検討したが、上述した各プローブの特異は高く、いずれも使用可能と判断された。その中で、病理切片上での反応において *N. fowleri* では Naeg2ish、

B. mandrillaris では Bala3ish、 *Acanthamoeba* では Acanth3ish の各特異プローブが優れた反応性を示した。

D. 考察

アメーバ性脳炎の原因となるアメーバ類は *Naegleria fowleri*、 *Balamuthia mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. が知られているが、その中で、生物テロに使用される可能性のある病原体としては、感染性の強さ、急性に進行する疾病形態、取り扱いの容易さ等から *Naegleria fowleri* が最も可能性が高いものと考えられる。当該アメーバは本来が自由生活性で、40℃前後の温水環境には容易に定着・生息する。したがって、人為的な環境汚染とそれに伴う感染を避ける対策の検討が必要である。

当該研究においては、迅速な病理診断法として in situ hybridization 法の開発を行った。その結果、3種類のアメーバを分別染色する特異プローブを得た。これまで、鑑別診断法として主に免疫抗体染色法が用いられてきたが、特異性の高い抗体を多量に得ることは困難で、限られた検査・研究機関での診断にとどまっていた。これに対し、in situ hybridization 法では特異プローブが開発された段階で、合成によりプローブの入手が容易となり、技術の普及とあわせてプローブの備蓄・供給などといった支援体制を構築する上で極めて有用と考える。

E. 結論

当該研究により開発された in situ hybridization 法のための特異プローブはカテゴリーCのバイオテロ関連疾患の病理診断に使用できることが確認された。また、わが国にも存在する *Balamuthia mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. など他のアメーバ性脳炎の原因アメーバとの鑑別診断が可能となった。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

6. Real time PCR 法を用いたニューキノロン耐性ペスト菌の迅速検出法の開発

分担研究者 廣瀬 健二 (国立感染症研究所・細菌第一部)

協力研究者 高橋英之 (国立感染症研究所細菌第一部)

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を Real time PCR 法を用いて迅速に検出する方法を確立した。ペスト菌の類縁菌である仮性結核菌のニューキノロン耐性株を用いて検討した結果、ニューキノロン耐性ペストの DNA gyrae の遺伝子 *gyrA* の変異四種と同一の変異に対しては Allelic discrimination assay によってニューキノロン感受性 (野生型 *gyrA*) のものと比較して優位に区別して検出することが可能であった。更にペスト特異的 DNA 領域 3a のプローブ、3a-VIC と野生型 *gyrA*-MGB-FAM プローブを用いた duplex real time PCR を実施することにより、ペスト菌の同定とニューキノロン感受性の同時判定が可能な系も確立した。

A. 研究目的

バイオテロリズムに使用されると想定されている微生物は、その重要度に応じてカテゴリーA,B,Cに分けられている。肺ペスト、腺ペストなどを引き起こすペスト菌は最も危険度の高いカテゴリーAに分類されている。使用される可能性のある病原体には、あらかじめ病原体の検出、診断、治療、予防に関する研究をまとめておく必要がある。また、遺伝子を改変し薬剤に耐性を持つ細菌が使用される可能性もある。現実に使用される病原体を予知することは不可能なので、現行の疾患サーベイランスと発生時対策にバイオテロに対する対策の準備を連携させることは不可欠である。本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を従来の培養方法や昨年度開発した PCR clamping 法よりもさらに迅速でペスト菌の同時同定も行なえる系の構築を検討した。

B. 研究方法

1) ニューキノロン耐性仮性結核菌の単離

論文上では既に試験管内でニューキノロン耐性ペストを作成し、DNA gyrae の遺伝子 *gyrA* のどの塩基に変異が入るかは明らかにされているが、当研究所ではニューキノロン耐性ペスト菌の臨床分離株を保持していない。一方で試験管内でのニューキノロン耐性ペス

ト菌の作成はバイオセーフティ上好ましくないと考え、ペスト菌 (*Yersinia pestis*) と同じエルシニア属に属し、ペスト菌と最も近縁な仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) のニューキノロン耐性を誘導することで作製した。またニューキノロン耐性を作成する前に仮性結核菌の *gyrA* 遺伝子の塩基配列を決定し、ペスト菌の *gyrA* 遺伝子と99%以上の同一性を示し、キノロン耐性決定領域(QRDR)の塩基配列は仮性結核菌とペスト菌で100%一致することを確認した(結果未掲載)。ニューキノロン耐性仮性結核菌は、非感受性菌を1 µg/mlのノルフロキサシンを含むブレイン-ハートインフュージョンプレートに塗布し、37°Cで三日間培養後、発育したコロニー(菌)を再度画線培養後、耐性菌を得た。その後、1組のプライマー *gyrA*-1:5'-ATG AGC GAC CTT GCC AGA GAA ATA-3', *gyrA*-4:5'-TAC CAG CAG GTT AGG GAT TCT GGT -3'を使用してPCR法により *gyrA* 遺伝子の QRDR を含む領域を増幅、シークエンスし、M2、M4 変異が導入されている事を確認した(図1)。ニューキノロン感受性仮性結核菌株(YPS1)、M2 変異株(YPS2)、M4 変異株(YPS8)の染色体DNAを1) DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて添付プロトコールに従って精製し、得られた染色体DNA溶液の最終濃度を吸光度で測定後、適量をPCRに供した。

A

M1	ACCACCCGCATGΔTGAACAGCGCGGTCT	Gly to Asp at pos 81
M2	ACCACCCGCATITGACAGCGCGGTCT	Gly to Cys at pos 81
M3	ACCACCCGCATGGTGAATAITGCGGTCT	Ser to Ile at pos 83
M4	ACCACCCGCATGGTGAACAGAGCGGTCT	Ser to Arg at pos 83
WT	ACCACCCGCATGGTGAACAGCGCGGTCT	Wild Type

B.

E. coli 67 ΔRVVGIDVIGKYIHPHGIDSAVYVDITVRMAQPFSRLRYMLVDGQ 106

		Number Identified: total	MIC in μg/ml
<i>Y. pestis</i> M1	D	37/65	4.10 (1.37)
M2	C	6/65	1.33 (0.44)
M3	I	11/65	1.31 (0.39)
M4	R	11/65	4.35 (1.09)

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

一方、最も頻度よく分離された変異の一つである M1 及び M3 変異をもつノルフロキサシン耐性仮性結核菌は今回の研究で分離されなかった (0/96) ため、1 組のプライマー、*gyrA*-M1-U: 5'-CAA CCC GCA TGA TGA CAG CGC GGT C -3', *gyrA*- M1-L :5' -GAC CGC GCT GTC ATC ATG CGG GTG G -3' (M1 変異導入用)、*gyrA*-M3-U: 5'-CGC ATG GTG ACA TCG CGGTCT ACG A -3', *gyrA*- M3-L :5' -TCG TAG ACC GCG CTG TCA CCA TGC G-3' (M3 変異導入用) と仮性結核菌の野生型 *gyrA* 遺伝子をマルチコピープラスミド上に保持する pHT335 を用いて部位特異的変異導入法によりプラスミドの形で変異導入し、その精製 DNA を希釈したものを pHT 350 (M1 変異)、pHT438(M3 変異) とし、M1 及び M3 *gyrA* 変異検出用の鋳型とした。

2) Allelic Discrimination assay

野生型 *gyrA* と変異型 *gyrA*(M1~M4) を区別するためにそれぞれを別の蛍光マーカーでラベルし、さらに Minor Groove Binding 分子を結合させた TaqMan MGB プローブを用いた。TaqMan MGB プローブを用いることにより Tm がエンハンシングされ、短いプローブでの塩基特異性が促進される効果が期待でき (図 2)。Allelic Discrimination assay は野生型及び変異型 *gyrA* に設定した二種の TaqMan MGB プローブを用いることにより二種の *gyrA* アリルを検出する (図 3)。

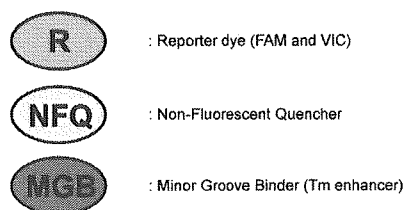
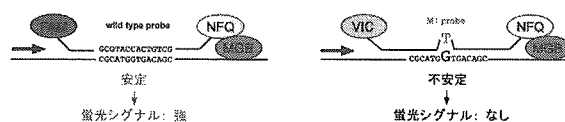


図2 MGB プローブの概略図

Wild type *gyrA* - FAMの蛍光が強く検出される



M1 *gyrA* - VICの蛍光が強く検出される

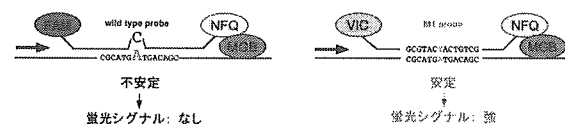


図3 Allelic Discrimination Assay による塩基置換検出法の原理

gyrA 野生型と M1 変異プローブを用いて野生型と M1 変異の検出例を示す。野生型 *gyrA* の鋳型に対しては野生型プローブ(FAM ラベル)が優位に結合し、PCR 反応によってシグナルを増強させていく。一方で、

反応液は以下のように調製した。プライマー及びプローブの希釈は用事調製で行なった。

TaqMan Universal Master Mix (2X)	12.5 ml
<i>gyrA</i> -F-rtPCR (9mM)	2.5 ml
<i>gyrA</i> -R-rtPCR (9mM)	2.5 ml
<i>gyrA</i> -WT-MGB-FAM (2mM)	2.5 ml
<i>gyrA</i> -M1(or others)-MGB-VIC (2mM)	2.5 ml
template DNA	x ml
H ₂ O	y ml
Total	25 ml

Takara PCR Thermal Cycler Dice を用いて下記プロトコールにより PCR 反応を行なった。

95°C×5min
 95°C×15sec
 61°C×30sec
 72°C×60sec

} 40 サイクル

反応後、PCR チューブを ABI PRISM 7000 にセットし、Allelic Discrimination のモードにて蛍光強度を測定した。

3) 3a-VIC 及び *gyrA*-WT-MGB-FAM 混合プローブによるニューキノロン感受性とペスト菌の同時検出

反応及び検出すべてを ABI PRISM 7000 にて行なった。PCR プロトコールは Allelic Discrimination assay と同様であるが、反応液の組成が以下のように異なる。

TaqMan Universal Master Mix (2X)	12.5 ml
<i>gyrA</i> -F-rtPCR (18mM)	1.25 ml
<i>gyrA</i> -R-rtPCR (18mM)	1.25 ml
<i>gyrA</i> -WT-MGB-FAM (4mM)	1.25 ml
3a-F (18mM)	1.25 ml
3a-R (18mM)	1.25 ml
3a-VIC (4mM)	1.25 ml
template DNA	x ml
H ₂ O	y ml
Total	25 ml

PCR チューブを ABI PRISM 7000 にセットし、Absolute determination モードにてリアルタイムで反応を検出した。

C. 研究結果

1) 各 *gyrA* 変異プローブの特異性

各変異に最適なプローブを作成した。各 *gyrA* 変異を持った PCR DNA を鋳型としてそのプローブの *gyrA* 変異に対する特異性を検討した。その結果、M4 プローブは若干他種のプローブに比べ特異性が低下するものの、すべての M1~M4 プローブに関して野生型とプローブに適合した *gyrA* 変異はそれぞれ Y 軸、X 軸に近い位置で検出され、それ以外の変異 DNA はほぼ対角線上のニュートラルゾーンに分布することが明らかとなった(図4)。この結果より、各 TaqMan MGB プローブによってニューキノロン耐性を誘導する *gyrA* の4タイプの変異を認識可能であることが確認された。

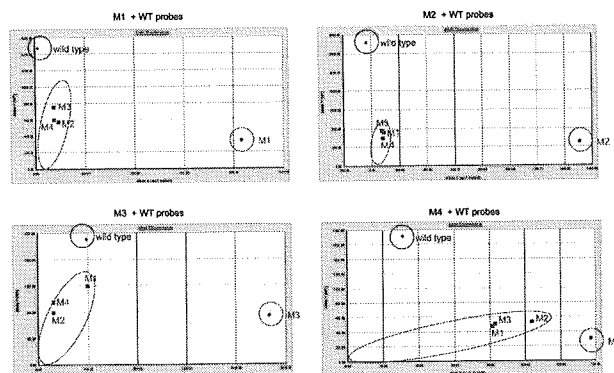


図4 各プローブの塩基特異性

野生型 *gyrA*-MGB-FAM と各変異 *gyrA*-MGB-VIC プローブを組み合わせてすべての鋳型に対するプローブの検出特異性を検討した。鋳型 DNA は図5に示される *gyrA* 領域を PCR で増幅した DNA1ng を用いた。

2) 精製された染色体 DNA 上の *gyrA* 遺伝子の変異検出

前項では鋳型として PCR 産物 1 ng を用いたが、これは約 2×10^{-15} mol 程度の鋳型 *gyrA* 遺伝子を使用していることになり、検出系の鋳型量としては多量であると考えられる。そこで、より実際の鋳型量での検出を検討するために、ニューキノロン耐性仮性結核菌株から染色体 DNA を精製し、その精製染色体 DNA を鋳型として *gyrA* 変異の検出とその限界量に関して検討を行なった。その結果、鋳型量 100 ng (約 $0.2 \text{ a}[10^{-18}] \text{ mol } gyrA$ 遺伝子) に対してプローブ特異的に *gyrA* 変異が検出されることが明らかとなった(図5)。さらに M2 変異、M4 変異に対して鋳型となる精製染色体 DNA 量を希釈し

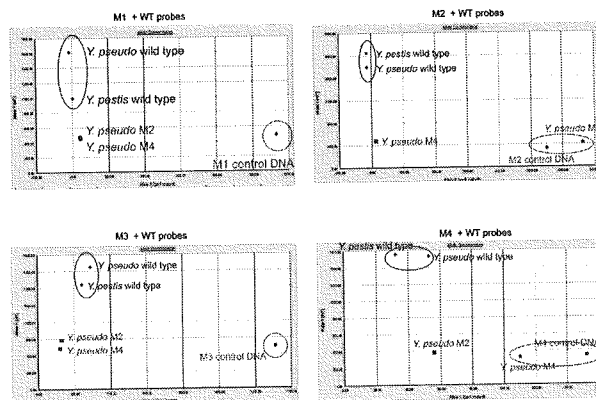


図5 精製した染色体 DNA 上の *gyrA* 変異の検出

野生型 *gyrA*-MGB-FAM と各変異 *gyrA*-MGB-VIC プローブを組み合わせてすべての鋳型に対するプローブの検出特異性を検討した。鋳型 DNA は Yreka (*Y. pestis*, wild type *gyrA*), YPS1 (*Y. pseudotuberculosis*, wild type *gyrA*), YPS2 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M2), YPS8 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M4) から単離された精製 DNA 100ng を用いた。

て検出限界の検討を試みた。その結果、M2 プローブに場合においては精製染色体 DNA 量が 10 ng、1 ng と少なくなる条件下においても判別可能な程度に野生型 *gyrA* は Y 軸寄りに、*gyrA* M2 変異は X 軸に近い位置で検出され、他の変異に比べ優位に判別可能であることが明らかとなった (図 6)。一方、M4 プローブにおいては識別が甘く、100 ng、10 ng までは判定可能であるが、1 ng では *gyrA* の他変異と区別が出来ない結果が得られた (図 7)。以上の結果から精製染色体 DNA を試料として用いた場合には検出限界は約 10 ng (約 0.02 a[10⁻¹⁸]mol *gyrA* 遺伝子)程度であることが推測された。

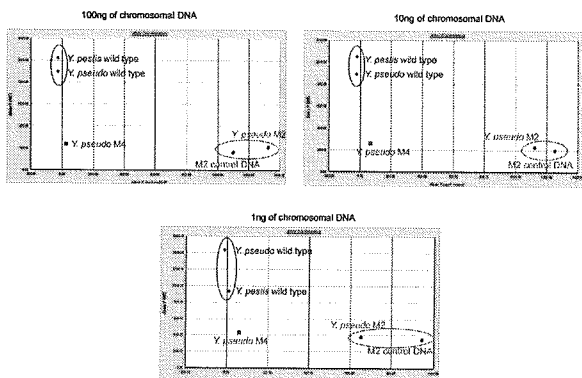


図 6 精製した染色体 DNA 上の *gyrA* 変異の検出限界 (M2 プローブの場合)

野生型 *gyrA*-MGB-FAM と M2 *gyrA*-MGB-VIC プローブの組み合わせの場合。Yreka (*Y. pestis*, wild type *gyrA*), YPS1 (*Y. pseudotuberculosis*, wild type *gyrA*), YPS2 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M2), YPS8 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M4) から単離された精製 DNA 100ng, 10ng, 1ng を鋳型 DNA、各プローブに対する変異 *gyrA* PCR DNA 1ng をポジティブコントロール DNA として用いた。

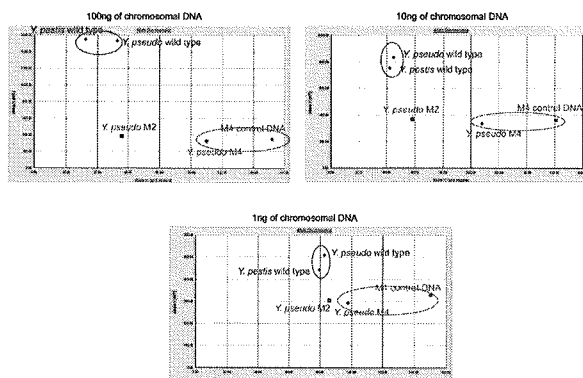


図 7 精製した染色体 DNA 上の *gyrA* 変異の検出限界 (M4 プローブの場合)

野生型 *gyrA*-MGB-FAM と M4 *gyrA*-MGB-VIC プローブの組み合わせの場合。Yreka (*Y. pestis*, wild type *gyrA*), YPS1 (*Y. pseudotuberculosis*, wild type *gyrA*), YPS2 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M2), YPS8 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M4) から単離された精製 DNA 100ng, 10ng, 1ng を鋳型 DNA、各プローブに対する変異 *gyrA* PCR DNA 1ng をポジティブコントロール DNA として用いた。

3) コロニーPCR による菌体内 *gyrA* 遺伝子変異の直接的検出の試み

バイオテロ発生時における検体はいろいろなものが想定されるが、中にはプレート上に分離培養された菌体も含まれると想定される。その際にその菌体から精製 DNA を分離することは判定結果を得るまでの時間的遅延を意味する。仮に菌体を直接反応液に摂取し、コロニーPCR 法が real time PCR 法でも可能であれば判定時間の短縮につながると考えた。そこで、コロニーPCR による *gyrA* 変異の検出が可能であるか否かの検討を試みた。直径 1 mm 程度の菌体を 25 ml の real time PCR 法の反応液に直接滅菌楊枝で摂取し、そのまま allelic discrimination assay を行なった。その結果、M1 及び M3 プローブでは野生型 *gyrA* は Y 軸に、変異型 *gyrA* は X 軸に近い位置で検出されているように見られ、一見検出可能であるように思われた (図 8)。しかし、同じ野生型 *gyrA* 遺伝子をもつ菌体でもシグナルの絶対値にばらつきがあり、その値が安定しないことが試験を繰り返すことにより明らかとなった (結果未掲載)。また、M2 及び M4 プローブでは野生型と変異型 *gyrA* 遺伝子を識別出来ていない結果が得られた (図 8)。以上の結果から、real time PCR による反応においてはコロニーPCR 法と同様の方法で菌体中の *gyrA* 遺伝子を直接検出することは不可能であることが確認された。

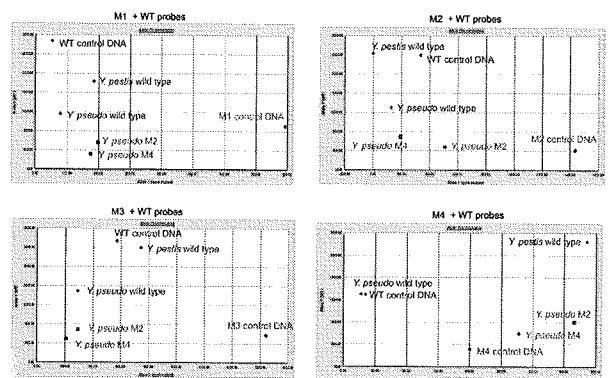


図 8 コロニーPCR による菌体中の *gyrA* 変異検出の試み

野生型 *gyrA*-MGB-FAM と各変異 *gyrA*-MGB-VIC プローブを組み合わせた反応液中に YPS1 (*Y. pseudotuberculosis*, wild type *gyrA*), YPS2 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M2), YPS8 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M4) の直径 1 ミリ程度のコロニーを滅菌楊枝で反応液に直接摂取しコロニーPCR による菌体中の *gyrA* 変異検出の試み。各プローブに対する変異 *gyrA* PCR DNA 及び野生型 *gyrA* PCR DNA 1ng、そして Yreka 熱失活処理のみのペスト菌粗液をポジティブコントロールとして用いた。

4) duplex real time PCR 法によるニューキノロン感受性及びペスト菌の同時判定

前三項の解析結果より、野生型 *gyrA* TaqMan MGB プローブは M1~M4 *gyrA* 変異をクリアに検出している結果が得られてきた (図 4~7)。その結果は *gyrA* 野生型、即ちニューキノロン感受性遺伝子を単独で特異的に検出する可能性を示唆していた。その系に *gyrA* TaqMan MGB プローブとは異なる蛍光色素をラベルしたペスト菌特異的プロローブを同時に用いて duplex real time PCR を行なえばペスト菌の検出とニューキノロン感受性の判定が同時に迅速に行なえらると思われた。そこで、*gyrA* TaqMan MGB プローブ (FAM) とペスト菌に特異的な染色体領域とされる 3a region をターゲットとしたプロローブ、3a-VIC を用いて duplex real time PCR 法によるニューキノロン感受性及びペスト菌 DNA の同時検出系の確立を試みた。100 ng の精製染色体 DNA を試料として用いた場合、*gyrA*M2、M4 変異遺伝子に対してはシグナルが指数関数的に増加しないのに対して野生型 *gyrA* 遺伝子はシグナルが指数関数的に増加していた (図 11 上)。3a に対するシグナルはペスト菌特異的であり、結核仮性菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) に対しては全く陽性反応を示さなかった (図 9 上)。以上の結果は *gyrA* の変異検出に対してはコントロールの設定が不可欠とはなるが優位に野生型 *gyrA* 遺伝子とペスト菌の同時検出が優位に実施可能であることが示された。さらに 10 ng 及び 1 ng の精製染色体 DNA を試料として検出限界の検討を行なった。10 ng の試料では 100 ng とほぼ同様に判定可能であった (図 11 中) が、1 ng では野生型 *gyrA* と M2 及び M4 変異との差が小さく、また 3a プローブの仮性結核菌に対する誤シグナルも検出された (図 9 下)。以上の結果から精製染色体 DNA を試料として用いた場合には検出限界は約 10 ng 程度であることが推測された。

D. 考 察

本邦においてはペストの治療薬としてニューキノロン剤の使用は十分に想定され、その耐性を調べるのには従来プレート上の培養法によるものが殆どであった。その培養法に依存し

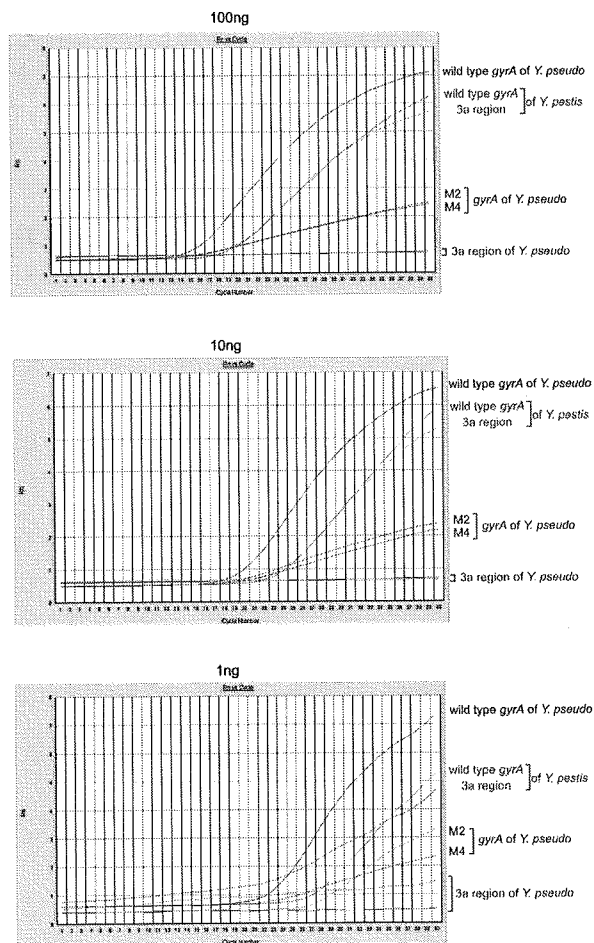


図 9 ニューキノロン感受性及びペスト菌の同時検出系の開発

野生型 *gyrA*-MGB-FAM とペスト菌特異的 VIC プロローブを組み合わせた反応液中に Yreka (*Y. pestis*, wild type *gyrA*), YPS1 (*Y. pseudotuberculosis*, wild type *gyrA*), YPS2 (*Y. pseudotuberculosis*, *gyrA* M2), YPS8 (*Y. pseudo-tuberculosis*, *gyrA* M4) の単離された精製 DNA 100ng, 10ng, 1ng を鋳型 DNA として用いた。

た場合には最低でも判定結果を得るのに 3 日間を要し、バイオテロの緊急検査法としては不十分であった。また、昨年度においては PCR clamping 法を用いたニューキノロン耐性株の検出方法を開発したが、これも検出結果が出るまでに約 4 時間を要した。本研究においては TaqMan MGB プロローブを用いた TaqMan real time PCR 法によって $0.02 \text{ a}(10^{-18})\text{mol}$ の変異 *gyrA* DNA が約 2 時間で検出可能となった。また、ペスト特異的 DNA 領域 3a のプロローブ、3a-VIC と野生型 *gyrA*-MGB-FAM プロローブを用いた duplex real time PCR 法によりペスト菌の同定とニューキノロン感受性の同時判定が 10 ng DNA のレベルで検出可能となった。

バイオテロの際には迅速且つ鋭敏な検査方

法が望まれ、本研究において開発した手法はそうしたバイオテロの際の迅速診断法として十分に機能することが期待出来る。

E. 結 論

Real time PCR 法を用いたバイオテロ発生時に採取された検体内のペスト菌 DNA とニューキノロン感受性の同時迅速検出系を開発した。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

7. クロストリジウム属菌および SEB 診断法の開発

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 向本雅郁、小崎俊司 (大阪府立大学)

諸角 聖 (東京都健康安全研究センター)

八柳 潤 (秋田県衛生科学研究所)

坂本 崇 (国立精神神経センター国府台病院)

銀永明弘、原川哲博 (化血研)

研究要旨 *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) と *C. septicum* α 毒素の早期検出系としてイムノクロマト法を開発するための検出用抗体を作成した。両毒素ともリコンビナント蛋白を作製し、免疫用の抗原とした。SEB に関しては 13 クローンの抗 SEB モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが 12 クローン得られ、その中で SEB との反応性が高い 2 クローンについて精製抗体を作製した。 α 毒素は 16 クローンのハイブリドーマが得られ、現在中和活性や反応性を検討中である。また、ウサギ抗 α 毒素ポリクローナル抗体を作製し、アフィニティー精製 IgG を調製した。

A. 研究目的

米国 CDC や CFR では生物テロに用いられる病原体の中で、細菌毒素はボツリヌス毒素、志賀毒素、*Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB)、ガス壊疽毒素に対して警告が発せられている。ボツリヌス毒素の診断法等は前研究班で終了したため、本研究班では SEB と代表的なガス壊疽疾患の主要病因である *Clostridium septicum* の α 毒素に対する早期診断法の開発を行う。

また、現在、厚生労働省においては、感染症法に基づきバイオテロに使用される恐れのある病原微生物等の規制を行うべく、法改正の検討が行われている。厚生労働科学審議会の感染症分科会で説明された資料によれば、規制対象病原体としてボツリヌス菌および毒素が含まれている。本研究班ではボツリヌス毒素等の使用、保管、輸送及び廃棄等について、治療、検査、研究等に携わる機関の現状を点検し、規制導入に際して留意されるべき点を整理した。

B. 研究方法

1) *S. aureus* enterotoxin B の精製と抗体の作成: 5'側に *EcoRI*、3'側に *HindIII* により切断される配列を付加したプライマーを用いて *S. aureus* (243 株) ゲノムを鋳型に enterotoxin B 遺伝子全長を PCR により増幅した。pET-30a

(Novagen) に挿入後、*E. coli* (BL21 codon plus) で His-tag 融合蛋白としてリコンビナント enterotoxin B (recEntB) を過剰発現させ、Ni-NTA (SIGMA) を用いて精製し、抗体作成用の抗原とした。

ポリクローナル抗体作成のため、ウサギ 2 匹に recEntB と Freund's Complete Adjuvant を等量混合し、ウサギ 1 匹当たりリコンビナント蛋白量で 10 μ g を皮内に接種した。その後、2 週間隔で 10、20、50、100 μ g と徐々に recEntB 量を増やし、Freund's Incomplete Adjuvant とともに追加免疫した。各免疫 1 週後に部分採血を行い ELISA により抗体価を測定した。

モノクローナル抗体作成のため、Balb/c マウス 5 匹に recEntB と Freund's Complete Adjuvant を等量混合し、マウス 1 匹当たりリコンビナント蛋白量で 10 μ g を腹腔内に接種した。初回免疫後、1 週後に 10 μ g、2 週後に 20 μ g、4 週後に 100 μ g を Freund's Incomplete Adjuvant とともに追加免疫した。最終免疫から 4 日後に脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行った。抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは ELISA により行い、クローニングは限界希釈法を用いた。

2) *C. Septicum* α 毒素の精製と抗体の作成

C. septicum (NCTC547 株) より α 毒素遺伝子

をPCRにより調製し、pET30aに挿入後、*E. coli* (BL21 codon plus)で His-tag 融合蛋白として protoxin を過剰発現させ、Ni-NTA を用いて精製し、リコンビナント α 毒素 (recAT) を調製した。0.4%ホルマリンで4日間透析することで不活化したトキシイドを抗原に用いた。

ポリクローナル抗体作成のため、ウサギ2匹にトキシイドと Freund's Complete Adjuvant を等量混合し、ウサギ1匹当たりリコンビナント蛋白量で25 μ g を皮内に接種した。初回免疫後、2週後に25 μ g を Freund's Incomplete Adjuvant とともに追加免疫した。2週後、トリプシン処理毒素50 μ g を筋肉内に接種し、2週後全採血を行った。抗体の精製はカプリル酸法とアフィニティークロマトグラフィーを用いて、アフィニティー精製ウサギ抗 α 毒素 IgG を調製した。

モノクローナル抗体は、Balb/c マウス5匹にトキシイドと Freund's Complete Adjuvant を等量混合し、マウス1匹当たり蛋白量で12.5 μ g を腹腔に接種した。初回免疫後、2週間隔で2回、12.5 μ g を Freund's Incomplete Adjuvant とともに追加免疫した。2週後にトリプシン処理毒素(10 μ g)を腹腔内に接種し、4日後、皮細胞を調製し、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞(P3U1)と細胞融合を行った。抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングはELISAにより行い、クローニングは限界希釈法を用いた。

3) 規制案では、ボツリヌス毒素および菌の取扱機関は、許可制度となる。取扱が予想される地方衛生研究所、大学及び国立研究機関、生物学的製剤製造所および臨床現場の専門家と各機関の使用実態と法施行に際し留意されるべき点を整理した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査許可を受けて行われた。

C. 研究結果

1) *S. aureus* 培養上清中の Enterotoxin B 産生量および精製の煩雑さを考慮して、リコンビナント毒素を免疫用の抗原として用いることとした。大腸菌より大量発現させ、高純度の recEntB を得ることができた(図1)。recEntB を抗原と

して免疫したマウス1匹を用いて細胞融合を行った結果、抗 EntB 抗体産生ハイブリドーマが12クローン得られた。その中でELISAによってSEBとの反応性が高い2クローンについて精製抗体を作成した。ポリクローナル抗体については、これまで5回の免疫を行い、血清中のELISA抗体価が128,000倍まで上昇しており、今後、あと1回免疫を行った後、全採血し精製ポリクローナル抗体を作成する予定である。recEntB は検出系を作成する際の陽性対照に用いる予定であるが、*S. aureus* から産生される EntB との毒素活性の違いについては検討していない。

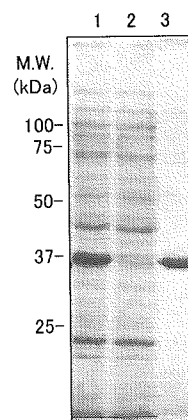


図1. recEntBの精製

1; Crude
2; Ni-Sepharose非吸着
3; Ni-Sepharose精製

2) *C. septicum* α 毒素についても陽性対照としての安定供給という考えからリコンビナント毒素を作成した。高純度の精製 recAT を得ることができ(図2)、その毒素活性は native 毒素とほぼ同程度であった(表1)。recAT を抗原として作成した抗 α 毒素抗体産生ハイブリド-

表1. Native毒素とrecombinant毒素のVero細胞に対する細胞傷害活性の比較

Alpha-toxin	EC50 (ng/ml)	
	protpxin	Trypsinized toxin
Native	24.3	65.5
recombinant	19.8	67.6

LD₅₀ of trypsinized toxin is approximately 10 μ g/kg body weight for mice