

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 部長

協力研究者 加来義浩、井上 智、野口 章、奥谷晶子 (感染研・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、同国の養豚産業界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、血清検査系、遺伝子検出系を整備することを目的とした。

B. 研究方法

1) DNA免疫によるNiV-N, P蛋白ウサギ抗血清の作製

NiV抗体検出ELISAにおける陽性血清、またNiV感染細胞における抗原検出用血清を大量に確保する目的で、NiV-N, P蛋白に対するウサギ抗血清を作製した。非特異反応が極力低い抗血清を得るため、免疫原にはNiV-N, P発現プラスミド(NiV-N/pCI-neo、NiV-P/pCI-neo)

を用いた。

免疫には、各蛋白あたりウサギ2羽を使用した。具体的には、まず上記プラスミド各200 µgを750 µlのDWに溶解し、アジュバントDMRIE-C (Invitrogen) 50 µlと混合した。15分静置した後、混合液を、ウサギ両背側2か所ずつ(計4か所)に200 µlずつ接種した。接種には、無圧力注射器シマジェット(島津製作所)を用いた。

初回免疫後、21、42、73、88、115日後に追加免疫を行った。また、初回免疫の直前、および各追加免疫の1週間後に試採血を行い、ELISA(後述)にて抗体価の測定を行った。抗体価の上昇が認められなくなったことを確認し、130日後に最終免疫を行い、その1週間後に全採血を行った。

血清の力価測定のためにELISAを行った。固相化抗原には、①NiV感染Vero細胞の可溶性(不活化)抗原液、②非感染Vero細胞の可溶性抗原液の2種を用いた。これらを1,000倍希釈し、96穴プレートに固相化した。被検血清はPBS(含0.5% Tween 20, 0.5% Triton X)で5倍希釈し、56°Cで30分間静置し、非働化した。次に、100倍希釈したVero細胞抗原液と等量混合し、30分間吸収した。続いて、9倍量のブロッキング液(PBS, 0.1% Tween 20, 5% skim milk, 5% chicken serum)と混合し、30分間静置した。最終的に100倍に希釈された血清を1次抗体として、100 µlずつ抗原プレートに添加した。2次抗体にはProtein AG (Pierce)を50,000倍希釈して用いた。発色はTMB基質液Sureblue (KPL)を用い、10分後に47%硫酸液で反応を停止した。最後に450 nmの波長で吸光度を測定した。

2) NiV-N 蛋白発現細胞を用いた抗体検出 IFA の確立

NiV-N 蛋白遺伝子をpKS336ベクターにクローニングし(NiV-N/pKS336)、以下の方法でNiV-N 蛋白発現細胞を作製した。

まず、transfection 反応前日にHEK293T細胞(ヒト胎仔腎臓由来)をコラーゲンコート96穴プレートに、70-90% confluencyになるように播きこんだ。翌日に、NiV-N/pKS336 100 ngを25 µlの無血清MEMに溶解し、Lipofectemine 2000 (Invitrogen) 0.5 µlを含む無血清MEM 25

µlと混合した。20分間静置し、上記HEK293T細胞液に添加した。37度で静置し、4時間後に培地を5%FCS入りMEMに交換した。さらに44時間後、培地を捨て、PBSで洗浄した。70%冷アセトンで2時間固定後、乾燥した。

IFAは以下の方法で行った。PBSで階段希釈した血清を70 µlずつ各ウェルに添加し、1時間反応させた。PBSで洗浄後、500倍希釈したFITC抗ウサギIgG抗体を70 µl添加し、1時間反応させた。PBSで洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) DNA 免疫による NiV-N, P 蛋白ウサギ抗血清の作製

経過血清の抗体価の推移を図1,2に示した。抗P血清のウサギNo.2を除き、追加免疫ごとに順調な抗体の上昇が認められた。

最終免疫後の全採血で得られた血清の抗体価を表1に示した。現在、診断用抗体検出ELISAの陽性対照血清に用いている、豪州家畜衛生研究所(Australian Animal Health Laboratory; AAHL)より分与されたブタ血清の抗体価もあわせて示した。今回得られた血清のうち、特に抗NiV-N血清(ウサギNo.1)は既存のブタ血清を上回る抗体価を示したほか、すべてのウサギ抗血清において、ブタ血清よりも非感染Vero細胞に対する非特異反応が低く抑えられていた。

2) NiV-N 蛋白発現細胞を用いた抗体検出 IFA の確立

NiV-N 蛋白発現HEK293T細胞および遺伝子非導入HEK293T細胞に対して、AAHLより分与された抗NiVウサギ抗血清(500倍希釈)を用いてIFAを行った結果を、図3に示した。また、今回DNA免疫により作製した抗NiV-Nウサギ抗血清(320倍希釈:ウサギNo.1、160倍希釈:ウサギNo.2)を用いてIFAを行った結果を、図4に示した。いずれの抗血清も、NiV蛋白発現細胞にのみ、特異的な蛍光が認められた。

また、上記の抗NiVウサギ抗血清、抗NiV-Nウサギ抗血清(No1,2)を階段希釈し、陽性検出限界を調べた。表2に示すように、抗NiV抗血清では4,000倍以上、抗NiV-N抗血清ウサ

ギ No.1 では 5,120 倍以上、No.2 では 1,280 倍～2,560 倍において、特異的な蛍光が確認できた。

D. 考 察

現在、感染研で可能な NiV 感染症の診断法は、1) 抗体検出法として、NiV 感染 Vero 細胞（可溶化・不活化済み）を固相化抗原として用いた ELISA、2) 抗原検出法として、ウイルス分離によって特異的な巨細胞を観察した後の IFA、3) 遺伝子検出法としてのリアルタイム PCR——の 3 種である。上記のいずれかにおいて、陽性または擬陽性反応が認められた場合には、確定診断として中和試験を行う必要があるが、国内で BSL4 施設が稼動していない現在、確定診断を海外研究機関に依頼せざるを得ない。そのため、国内で使用可能な、特異性の高い診断法の選択肢をなるべく多く確保することが急務である。また、現在、抗体・抗原検出法に用いている固相化抗原および抗血清は、いずれも AAHL より分与を受けたものであることから、これらの資材は国内で再生産できるものに切り替えていかなければならない。

本年は、まず DNA 免疫により、抗 NiV-N, P 蛋白抗ウサギ血清を作製し、抗体検出 ELISA における陽性血清として使用可能かどうか検討した。現在、感染研で行っている ELISA は、AAHL プロトコールに沿ったものであり、結果の解釈は、1) NiV 感染 Vero 細胞 ウェル (NiV-well) における OD 値、2) NiV-well と非感染 Vero 細胞 well (Vero-well) の OD 値の比 (S/N 比) によってなされる。すなわち、NiV-well の OD 値が 0.2 以上、かつ S/N 比が 2 以上の検体が”reactor”と解釈され、確定診断の対象となり、それ以外はすべて陰性と判断される。このためには、陽性対照血清は少なくとも上記の”reactor”条件を満たす必要がある。表 1 に示すとおり、今回作製された抗血清はいずれもこの条件を満たしていた。現在陽性対照血清に用いている抗 NiV 抗ブタ血清と比較しても、抗 NiV-N 抗血清ウサギ No.1 は、これを上回る反応性を示した他、すべてのウサギ抗血清はブタ抗血清よりも Vero-well での値（すなわち非特異反応）が著しく低く抑えられていた。今回同時に行った抗 NiV ウサギ抗血清（AAHL よ

り分与）を用いた ELISA では、Vero-well の値が 0.462 であったことから（データは示さず）は、今回作製した抗血清の非特異反応の低さは、免疫原に DNA を用いたためと考えられる。

続いて、抗体検出系の充実を図る目的で、NiV-N 蛋白発現細胞を用いた抗体検出 IFA を試みた。図 3、4、表 2 に示すとおり、抗 NiV、NiV-N ウサギ抗血清は、NiV-N 発現細胞に特異的に反応していた。同時に、先述の NiV-N ウサギ抗血清が、本 IFA の陽性対照血清としても使用できることが確認された。本 IFA は、可能であれば、上記 ELISA で”reactor”反応が得られた際に、確定診断に回す検体数を絞り込む目的で使用されることが期待される。そのためには、”reactor”や陰性血清を含む、ヒト・動物の多くの検体に対するデータを蓄積し、感度・特異性を確認する必要があると考えられる。

E. 結 論

DNA 免疫により、NiV-N, P 蛋白に対するウサギ抗血清を作製し、ELISA での反応性を確認した。現在、陽性対照血清として使用している抗 NiV ブタ血清と比較したところ、ウサギ抗血清の反応性・特異性はきわめて良好であることから、陽性対照血清として使用可能であることが確認された。

また NiV-N 蛋白発現細胞を用いた抗体検出 IFA を開発したが、診断法の一つとして確立するためには、今後、ヒト・動物の多くの検体に対するデータを蓄積し、感度・特異性を確認する必要がある。

F. 健康危険情報

とくになし

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

図1 抗NiV-N抗血清 抗体価の経過 (ELISA)

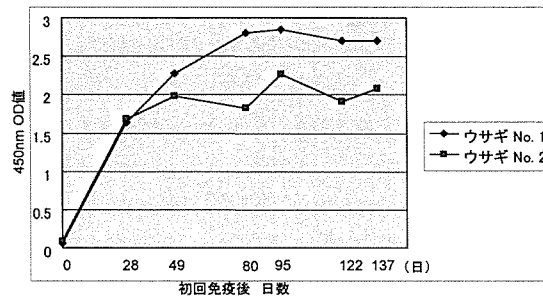


図2 抗NiV-P抗血清 抗体価の経過 (ELISA)

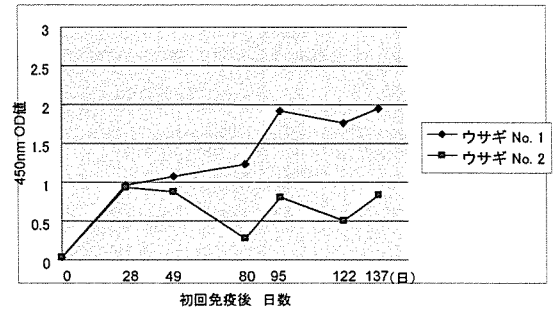


表1 既存血清との抗体価の比較

抗血清	固相化抗原	
	NiV感染 Vero細胞	非感染 Vero細胞
DNA免疫により作製(感染研)		
抗NiV-N ウサギ No.1	2.702	0.021
抗NiV-N ウサギ No.2	2.072	0.016
抗NiV-P ウサギ No.1	1.946	0.031
抗NiV-P ウサギ No.2	0.831	0.000
豪州家畜衛生研究所より分与		
anti-NiV プタ	2.536	0.274

図3 NiV-N蛋白発現細胞を用いた抗体検出IFA(1)
抗NiVウサギ抗血清(AAHLより分与)に対して (X500)

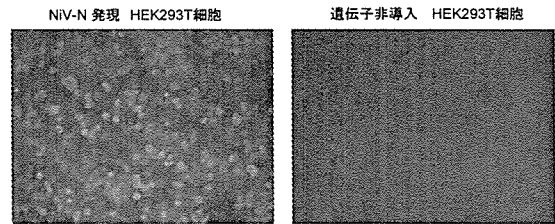


図4 NiV-N蛋白発現細胞を用いた抗体検出IFA(2)
DNA免疫による抗NiV-N ウサギ抗血清に対して

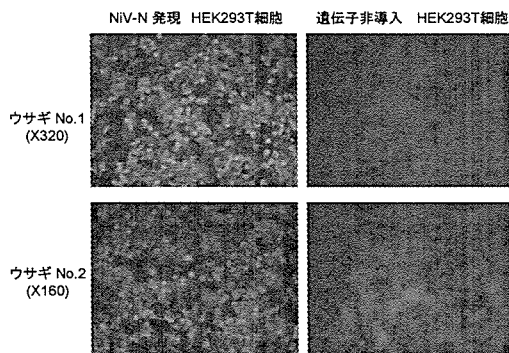


表2 IFA計測可能な倍率の比較

血清	倍率
抗NiVウサギ (AAHL)	>X4,000
抗NiV-N ウサギ No.1	>X5,120
抗NiV-N ウサギ No.2	X1,280-X2,560

4. Q熱のスクリーニングに用いる血清診断法の検討

分担研究者 岸本 壽男 国立感染症研究所ウイルス第1部 第5室

協力研究者 安藤秀二、小川基彦（感染研・ウイルス第1部第5室）
福士秀人（岐阜大農学部・獣医・獣医微生物学）
蔡 燕、矢野竹男、中尾義喜（オリエンタル酵母工業(株)・
長浜生物科学研究所）

研究要旨 バイオテロに Q 熱コクシエラ (*C.burnetii*) が用いられた場合を想定し、患者特定に重要なスクリーニングのための血清診断法の検討を行った。Q 熱の血清診断において、従来の *C.burnetii* 感染細胞を抗原とした IFA 法での陽性判定には非特異反応による偽陽性の結果がしばしば問題となっており、Q 熱疑い患者にスクリーニングとして用いた場合、臨床現場での混乱が予想される。今回その非特異反応の問題を解決するため、非特異反応除去剤の検討を行い、改良法を開発、実用化した。これまでの低値陽性例が多いとされたいわゆる本邦独特の非典型 Q 熱は、本法の非特異反応除去剤によって陰性となる例も出てくる可能性があり、今後本法による再検討の必要性が示唆された。

A. 研究目的

Q 熱は *Coxiella burnetii* (*C.burnetii*) を原因菌とする人獣共通感染症である。これまでは感染症法の第4類全数報告疾患であり、今後の改正によって第3類に再編成される予定である。また CDC のバイオテロリズム対策の中に Q 熱が挙げられており、*C.burnetii* が熱や乾燥に耐性であることから、吸入感染や経口感染を想定したバイオテロリズムに用いられる可能性がある。

本症は、特異的な臨床所見に乏しく、他の発熱性疾患や呼吸器感染症、肝炎や不明熱、慢性疲労症候群様疾患などとの臨床的な鑑別が困難である。本来非特異的な症状を呈することが多い Q 熱では、バイオテロに *C.burnetii* が用いられたことを想定した場合、病原体のヒトや環境からの検出とともに、スクリーニングのための血清診断法が重要となる。

血清診断法については、これまでは、精製抗原や *C.burnetii* 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA 法) が標準法として主に利用されてきたが、精製抗原は作成が容易でないため、実際には抗原の作成が比較的簡便なことから *C.burnetii* を感染させた Vero 細胞の利用が主体となっている。しかし、*C.burnetii* 感染細胞を用いたものについては、細胞内の封入体様構造物

の蛍光と細胞外の粒子の両者が蛍光を発することが陽性の判定には必須であり、封入体のみの蛍光では非特異反応とされているが、実際にはその鑑別が困難なことも多く、診断上の混乱を招いている。そこで今回、非特異反応による陽性判定の問題点を解決するため、非特異反応除去剤の有用性の検討を行った。

B. 研究方法

材料と方法：

1) 細胞固相化スライドの作製方法：

C.burnetii Nine Mile 株を感染させた Vero 細胞及び非感染 Vero 細胞を等量混合し、リング付きスライドグラス上で一昼夜培養後、接着した細胞をアセトンで固定した。

2) 非特異反応除去と抗体の検出：

血清の希釈は従来の塩類溶液である PBS-0.5%BSA と、今回作成した非特異反応除去剤を PBS に加えたもの (OYC 希釈液) をそれぞれ用いた。血清を 16 倍から 2ⁿ 倍希釈し、スライド上の細胞と反応させ、二次抗体として FITC 標識した IgG (γ) 抗体、IgM (μ) 抗体を用いて検体中の抗コクシエラ抗体を検出した。

また、リウマチ因子(RF)の関与を見るためRF値が1000 IU/ml以上の血清を用いて検討した。

3) 実際の検体での応用:

Q熱疑いで検査依頼された検体304検体を測定した。

4) 判定

スライドを蛍光顕微鏡で観察し、以下の染色パターンと検体希釈倍数で判定した。
 染色パターンの判定:陽性:細胞内黄緑色の封入体及び細胞外散在の黄緑色の粒子が観察される。
 陰性:細胞内黄緑色の封入体のみ観察される。
 または黄緑色の封入体、粒子ともに観察されない(図1)。

判定基準:検体希釈倍数において、IgGクラス:64倍未満は陰性、64~128倍は判定保留、256倍以上は陽性。IgMクラス:32倍未満は陰性、32~64倍は判定保留、128倍以上は陽性とした(図1)。

染色像のパターンおよび判定基準

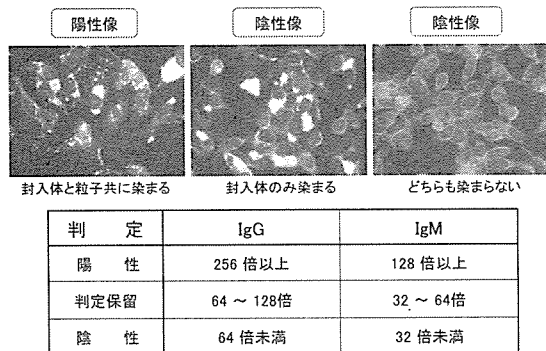


図1

C. 研究結果

通常のPBS-0.5%BSAを希釈液とした場合、多くの検体に非特異的な反応がみられたが、PBSに非特異反応除去剤を混合したOYC希釈液を使用することによりほぼ完全に非特異反応を除去することができた(図2)。

蛍光染色像には2種類のパターンが観察された。すなわち細胞内黄緑色の封入体及び細胞外散在の黄緑色の粒子が観察される蛍光像および細胞内黄緑色の封入体のみが染色された蛍光像であった。Q熱確定患者はすべて前者の蛍光像を示したことから、前者の蛍光像のみがコクシエラ抗体陽性の場合のパターンであると判断された。

またRF高値の血清でもOYC希釈液を用いることでIgG、IgMともに特に非特異反応は認められなかった(図2)。

Q熱疑いで検査依頼された検体304検体を本法で測定したところ、診断基準を満たす陽性は1検体(IgG)のみで検出された。

非特異反応除去剤を含む検体希釈液の検討

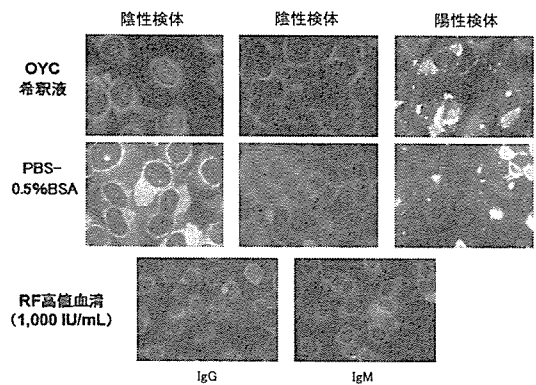


図2

D. 考察

今回、開発したOYC希釈液は簡便に非特異反応を抑えることが可能であり、的確な結果が得られたことから、抗コクシエラ抗体検出のためのスクリーニング検査法として有用性が高いと考えられた。OYC希釈液は血清を希釈しそのまま測定に利用できるため、非特異反応を除去するための検体前処理を必要としない点で利便性にも優れている。ただし、抑えられた非特異物質についての詳細は不明であり、さらに検討を要する。

今回の成績から、これまでの低値陽性例が多いとされる、いわゆる本邦独特の非典型Q熱は、本法の非特異反応除去剤によって陰性となる例も出てくる可能性があり、今後本法による再検討の必要性が示唆された。さらに実際の検体や症例でのデータの蓄積をすることで、実践的な対応に備えたい。

E. 結論

バイオテロに*C.burnetii*が用いられた場合を想定し、患者特定に重要なスクリーニングのための血清診断法の検討を行った。Q熱の血清診断において、非特異反応が問題となっていた従来の*C.burnetii*感染細胞を抗原とし

た IFA 法を、非特異反応除去剤を使用する OYC 希釈液によって、改良し実用化できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) 安藤秀二、岸本寿男：バイオテロリズムとダニ媒介性感染症。SADI 組織委員会編「ダニと新興再興感染症」全国農村教育協会、2007 年（印刷中）
- 2) 岸本寿男、安藤秀二、小川基彦：Q 熱の現状と課題。SADI 組織委員会編「ダニと新興再興感染症」全国農村教育協会、2007 年（印刷中）

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. 社会不安を誘導することを目的とした故意の汚染に使用される可能性のある原虫類対策に関する研究

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所寄生動物部 部長

協力研究者 泉山信司、八木田健司（感染研・寄生動物部）
高橋 均（新潟大学脳研究所・病理学分野）
百田隆祥（栄研化学・生物化学研究所）

研究要旨 社会不安を誘導することを目的とした故意の汚染に使用される可能性のある原虫類として、*Naegleria fowleri* および *Cryptosporidium parvum* (genotype 1, 2) があげられる。当該研究では *N. fowleri* の感染に起因する急性の原発性アメーバ性脳炎 (Primary Amoebic Meningoencephalitis) とその他のアメーバ性脳炎 (Granulomatous Amoebic Encephalitis) および赤痢アメーバ性脳炎との鑑別診断にむけて、それぞれに特異的な *in situ* hybridization 用のプローブを設計した。必要に応じてプローブの供給体制も整えた。水道等を対象とした故意の汚染は社会的に極めて大きなインパクトを与える。その際に用いられる可能性のある原虫として *C. parvum* があげられる。本原虫はわが国にも存在し、多量に入手することも不可能ではない。水道で本原虫が問題となる理由は、その感染形である oocyst が 5 μ m 程度と小さく、通常のろ過処理では完全に除しきれないこと、また、塩素消毒に対して極めて強い耐性を示すことによる。その対策としては、比較的多量の水道の濃縮と迅速検出法が必要で、可溶性の粒子を用いたケーキろ過濃縮（特願 2006-211340）と Lamp 法（遺伝子検出法）の適正配置によるモニタリングシステムを提案する。

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因病原体は *N. fowleri* に限らず、*B. mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. および赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の報告があり、鑑別診断の必要性から本研究ではこれら 4 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。

一方、*Cryptosporidium parvum* も水道あるいは親水施設を対象とした故意の汚染に用いられ

る可能性のある原虫である。本原虫の検出は比較的多量の水の濃縮と迅速検出法が必要で、可溶性の粒子を用いたケーキろ過濃縮（特願 2006-211340）と Lamp 法（遺伝子検出法）によるモニタリングシステムを提案する。

B. 研究方法

1) *in situ* ハイブリダイゼーション

Naegleria fowleri オリゴプローブ：

Naeg1ish :

ACGAGCTTGTGGTGGCCCCACGACAGCTTT
CGCCTTAGTTG

Naeg2ish :

GCACAACGATTTATTTACAGTTGCAACC
CAAAGGGGCTC

Naeg3ish :

CCAATGGCTGCTCTAAGGGTTATCTACACC
CAAATCATGG

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。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。

Acanthamoeba オリゴプローブ :

Acanth2ish :

GGGTTTTGATGGACGGGTTAGCGCGGCAT
ATTTAGCAGGT

Acanth3ish :

TCTAAGAAGCACGGACGCCGAACCCTA
CCGCCACACGGA

A. castellanii の登録されている配列 (AF251938) を基準として 1733–1772 の間とした。

Balamuthia mandrillaris オリゴプローブ :

Bala2ish :

GCTCACCCCCTGGTTTTGAATAGCAGGATT
GGCATGACTA

Bala3ish :

AAGAAGTACTTCTACCAATCCAACCGCC
AGAAGGCAAGGG

B. mandrillaris の登録配列 (AF019071) を基準として 1528–1567 の間とした。

Entamoeba histolytica オリゴプローブ :

EhrR250 :

GCCACGACAATTGTAGAACACACAGTGTTT
AACAAAGTAAC

EhrR1038 :

GATGTACAAAGATAGAGAAGCATTGTTTCT
AGATCTGAGT

EhrR1403 :

AAGAACAGGTGCGTAAGTACCACTTCTTA
AAGGGACACAT

EhrR1623 :

GGCTTTGTCTAATAATTAAGGATAGTAAG
TGGTGTACCGA

E. histolytica の rRNA gene 登録配列 (GenBank Acc No., X64142) を基準として、1623-1662 の間とした。

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 1pmol/μl となるよう希釈し、分注して凍結保存した。

【染色方法】

①手順

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ピロジェンおよび RNase 除去精製水に 3 分程度浸漬して水和し、静置した切片上に 300 μl のハイブリ用緩衝液 (10%ホルムアミド、2 倍濃度標準食塩クエン酸緩衝液 (2×SSC、150 mM NaCl, 15 mM 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)) を重積して 37°C、30 分間反応させた。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、50°C、1 時間反応させた。反応後、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 回を行い、再び TBS 溶液で 3 分間程度浸漬した。

③発色

内在性 catarase の不活化のために、切片標本を 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 (50mM Tris-HCl pH7.6、0.3M 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。

2) 飲料水ならびに親水施設におけるクリプトスポリジウム汚染モニタリングシステムへの提案

クリプトスポリジウム等の水系汚染のモニタリングシステムにおける最大の課題は試料水の濃縮であり、最も時間を要する工程である。そこで可溶性粒子を用いたケーキろ過(特願2006-211340)による試料水の濃縮を提案し、合わせてLAMP法による原虫の検出により迅速化を図る。

C. 研究結果

1) 病理組織像

わが国における*N. fowleri*感染事例においては典型的な原発性髄膜脳炎(PAM)の像を呈し、病変部は脳底部の脳表側に集中する傾向が示される。組織中のアメーバ虫体はおおむね直径10µm程度で、組織内で嚢子形成しない。これに対し、*Balamuthia*や*Acanthamoeba*、赤痢アメーバの感染では肉芽腫性脳炎の像を呈し、アメーバ栄養体は12µm以上と大きく、一般に不揃いである。赤痢アメーバを除き、これらのアメーバは組織内で嚢子形成を行なう。

組織内の*N. fowleri*はPAS陰性であるのに対し、*Acanthamoeba*や*Balamuthia*では弱陽性～陽性のPAS好染性顆粒が観察される。赤痢アメーバはPAS強陽性である。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。

In situ hybridization 法

*In situ hybridization*法を用いて病理切片上のアメーバ類の鑑別診断法の開発を行った。それぞれのアメーバに特異的なプローブを用い、標的アメーバの細胞内に強いシグナルを確認し

た(Fig. 1)。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。

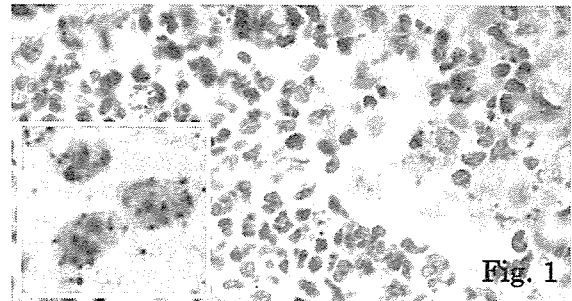


Fig. 1. 病理切片上の*Naegleria fowleri*のISH染色像。組織内で増殖する*N. fowleri*に*in situ hybridization*法による強いシグナルが得られる。挿入枠内は高倍率での観察では用いた試薬の特性からアメーバ内は点状の染色像となる。

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。なお、*Balamuthia mandrillaris*は未だにその感染経路が明らかとなっていないが、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。当面は、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*感染との鑑別診断には欠かせない対象と考える。Fig.2は*B. mandrillaris*による感染脳病理切片のISH像である。当該プローブは*N. fowleri*との間に交差反応は認められなかったが、*Acanthamoeba*との間で反応条件を緩やかにすることにより微弱な交差反応が観察された(Fig.3)。

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適用することで標的のアメーバを蛍光染色として観察することが可能である。本染色方法はアメーバのスクリーニングに適しており、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となる(Fig. 4)。

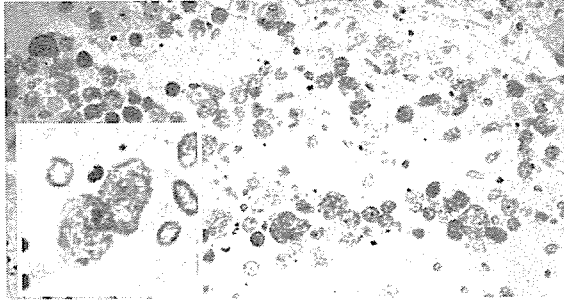


Fig.2 病理切片上の *Balamuthia mandrillaris* の ISH 染色像。
Naegleria の染色像と同様に、アメーバの細胞内に ISH 法による強いシグナルが得られた。*Balamuthia* は血管周囲に集中して見られることが多い。虫体の大きさは一様ではなく、変化に富む。挿入枠内はアメーバの強拡大像。ヘマトキシリンによる核のカウンター染色像において、栄養体が鮮明に観察される。

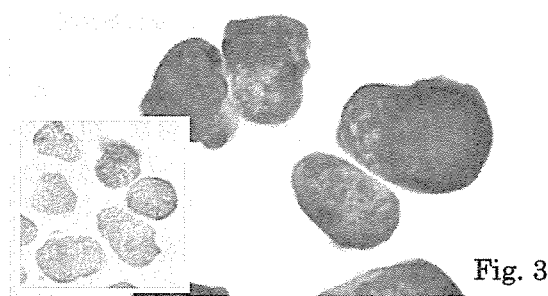


Fig. 3 *Entamoeba histolytica* の ISH 染色像。
赤痢アメーバの栄養体の ISH 染色像。挿入枠内は陰性対照。

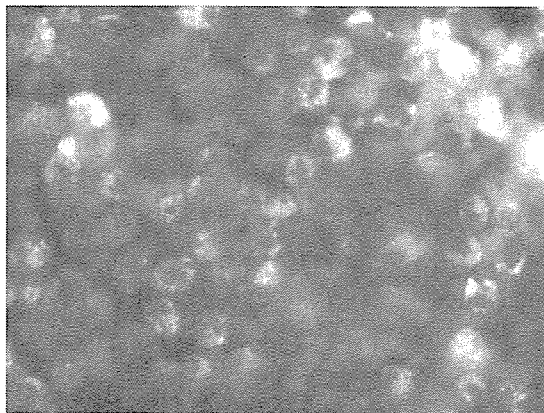


Fig. 4. *Naegleria fowleri* の FISH(蛍光ハイブリダイゼーション法)像。
同一のプロープをもちい、発色方法を DAB-Peroxidase 反応から Alexa488 標識アビジン法に変更適用することで標的アメーバを蛍光染色が可能となる。蛍光染色はスクリーニングに適しており、Evans Blue によるカウンター染色を行うことで補色対比による緑色の特異蛍光を強調することが可能となる

2) 飲料水ならびに親水施設におけるクリプトスポリジウム汚染モニタリングシステムへの提案

飲料水等を標的とした故意の汚染対策では多量の試料水の効率的な濃縮作業が求められる。水道水におけるクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策として別途研究事業が展開されており、各種濃縮方法が検討されてきた。その中で、可溶性多孔質粒子をろ材として用いたケーキろ過が提案されている(主任研究者:眞柄 泰基:最近の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究;特願 2006-211340)。ケーキろ過の原理は均一な微細粒状のろ材を支持体の上に重積し、粒子間に形成される間隙をろ過孔径としたろ過方法で、砂ろ過等がこの範疇に入る。本ろ過の特徴は多量の試料水を迅速にろ過することができることである。さらに、ケーキろ材を可溶化することで補足粒子の迅速回収を可能としている。ちなみに、補足・回収を目的とする病原体(ここではクリプトスポリジウムのオーシスト)の直径を(x)とすると、用いるろ材粒子の直径(r)は以下の式で得られる。

$$x = \left(\frac{2}{\sqrt{3}} - 1 \right) r$$

ケーキろ過装置をモニターすべき給水栓等に in line 設置し、必要量の水を流して水中の粒子の捕捉を行う。

LAMP法による標的 DNA の増幅:

検出方法には特異遺伝子増幅試験である LAMP 法が開発されており、*Cryptosporidium* 属特異的なプライマーセットが用意されている。いずれの種においても所定の反応時間内に標的 DNA の増幅が確認されている (Fig. 5)。緊急時においても、およそ 3 時間で結果が得られるものとする。

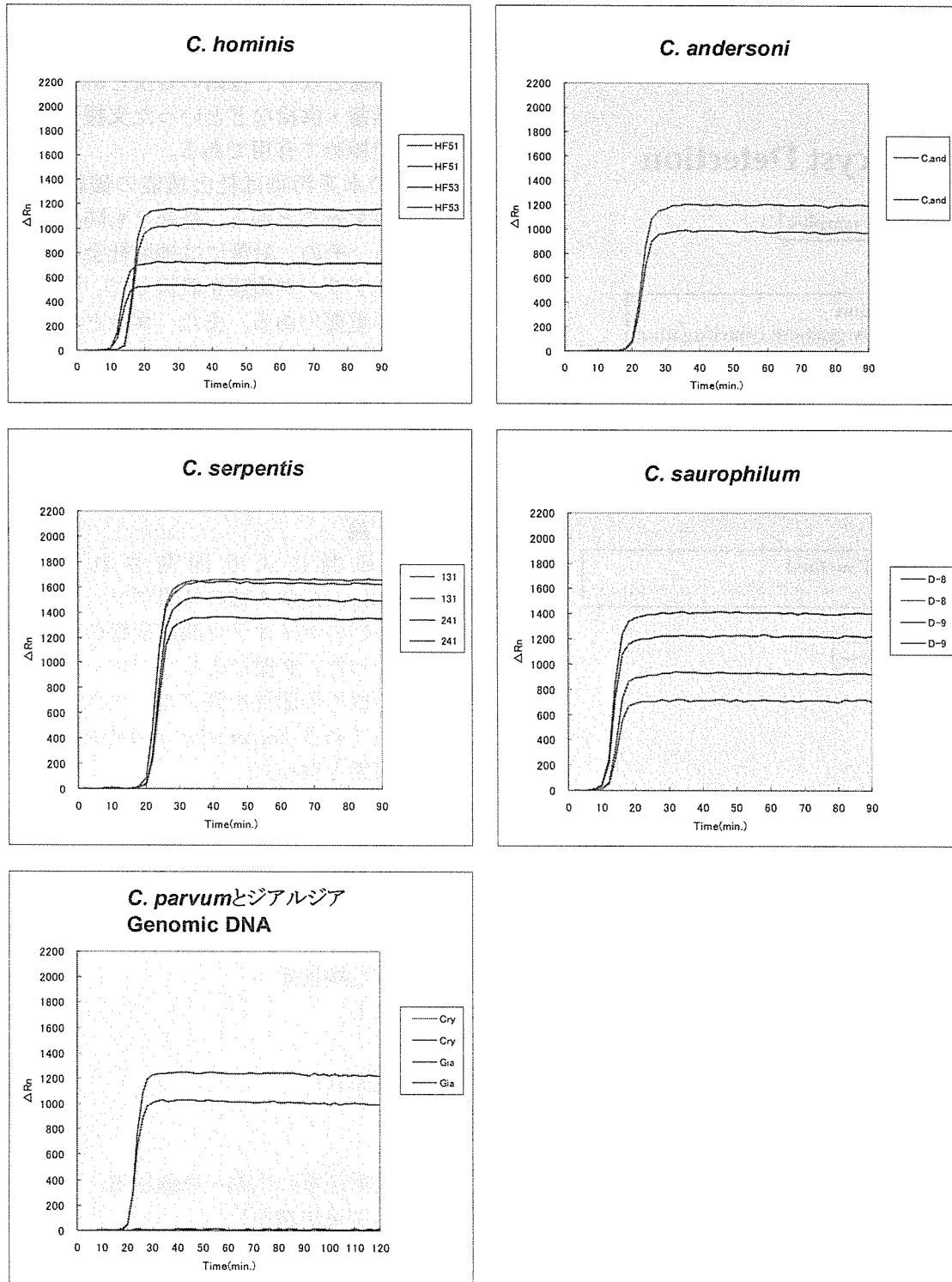
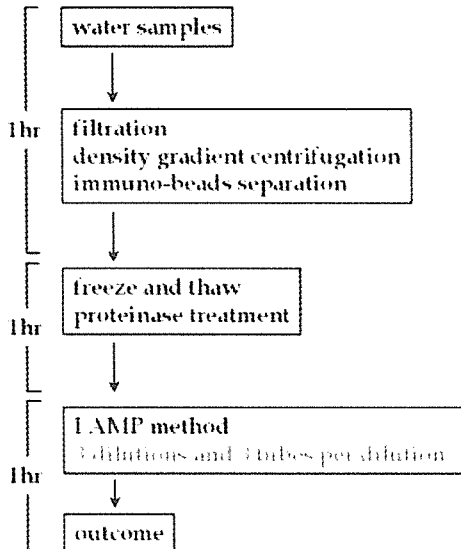


Fig. 5. Cryptosporidium 属の原虫を対象に行った LAMP 法
 当該研究事業ではクリプトスポリジウム属の原虫種に広く反応するプローブの開発を行った。

一連の操作法は、以下の通りである。緊急時においても、およそ3時間で結果が得られるものとする。

Oocyst Detection



D. 考察

社会不安を誘導することを目的とした故意の汚染（テロ行為）に使用される可能性のある原虫類として、*Naegleria fowleri* および *Cryptosporidium parvum* (genotype 1, 2) の2種類は特に注意が必要である。

アメーバ性脳炎の原因となるアメーバ類は *Naegleria fowleri*、*Balamuthia mandrillaris*、*Acanthamoeba* spp. および本来寄生性の *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) が知られている。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、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°C 前後の温水環境に容易に定着・生息する。したがって、故意の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。当該研究では *in situ* hybridization 法の開発を行い、4種類のアメーバを分別染色する特異プローブを作製した。これまで、鑑別診断法としてもつばら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る。これに対し、*in situ* hybridization 法では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である。

故意の水系汚染は社会機能の破綻や社会不安を助長することから、是非とも防止すべきものである。その、対策には地域社会において複数のモニタリング施設を設置して、常時監視することが重要である。また、事故と故意の汚染との区別も極めて重要と考える。モニタリングシステムの構築に際して、律速となる工程は試料水の濃縮作業で、当該研究事業ではケーキろ過を提案した。

E. 結論

当該研究により開発された *in situ* hybridization 法の4種類の特異プローブによりカテゴリCのバイオテロ関連疾患の病理診断が可能となった。必要に応じてプローブの供給体制、診断協力の耐性を整えた。また、本来寄生性の原虫である *Entamoeba histolytica* との鑑別診断も可能となった。

故意の水系汚染を防ぐべく、ケーキろ過-LAMP法を用いたモニタリングシステムを提案した。

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

なし（別途申請中）

6. サイクリングプローブ法を用いたニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の迅速診断法の開発

分担研究者 高橋 英之 国立感染症研究所細菌第1部 主任研究官

協力研究者 森田昌知 (感染研・細菌第1部・研究員)

伊藤健一郎 (感染研・感染症情報センター・室長)

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるチフス菌・パラチフス A 菌のニューキノロン耐性をサイクリングプローブ法を用いて迅速に検出する方法を確立した。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株の DNA *gyrae* の遺伝子 *gyrA* の変異 5 種をサイクリングプローブ法により、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できた。

A. 研究目的

バイオテロ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 に分けられており、腸チフス、パラチフスの原因菌であるチフス菌・パラチフス A 菌などの食品や水で媒介される病原体はカテゴリー B の中に含まれている。それらの病原体には、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。現実的には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腸チフス・パラチフスの耐性菌であるニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌を従来の培養方法より迅速にスクリーニングする方法を開発、検討した。従来より Taqman プローブやアレル特異的プローブを用いて試したが、ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 遺伝子の 1 塩基変異を野生株ときれいに分離して検出することは出来なかった。そこで、DNA と RNA のハイブリットプローブに蛍光物質とクエンチャーを付加したプローブをリアルタイム PCR 法に用いることにより点変異を検出するサイクリングプローブ法を本研究でその有用性を検討した。

B. 研究方法

1) ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス菌の作製と染色体 DNA の精製

疫学的には文献上 DNA ジャイレースをコードする遺伝子 *gyrA* のコドン 83 番と 87 番に変異が導入することによりニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌が発生することが明らかとなっている。しかし、ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌は我々の臨床分離株ストック中には存在しないため、まずそれらの耐性を誘導することでニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌を作製した。ニューキノロン耐性菌は、感受性菌を低濃度 (0.002 µg/ml) のシプロフロキサシンを含む L ブロスに接種し、この濃度に発育した菌をさらに 2 倍濃度のシプロフロキサシンを含む L ブロスで培養することを繰り返し、耐性菌を得た。耐性菌のシプロフロキサシンの MIC は 4 µg/ml 以上であった。その *gyrA* 遺伝子の変異導入部位を確かめるために PCR 法で *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、疫学的に分離されたニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌と同様に *gyrA* 遺伝子の 83 番目のコドン TCC (Ser) が TTC (Phe) もしくは TAC (Tyr) に、または 87 番目のコドン GAC (Asp) が TAC (Tyr) または AAC (Asn) 、GGC (Gly) に変異しているのが確認された。これらの変異は文献で報告

されている *gyrA* 遺伝子の変異と同様で本研究においても *gyrA* 変異遺伝子を保持するニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌(表 1)を用意することが出来た。それらの菌を寒天培地で培養後、等量を市販のゲノム抽出キット (Qiagen) を用いて精製し、PCR template DNA として供した。

表 1 サイクリングプローブ法の検証に用いたチフス菌株

菌株	codon83	codon87
Ty2	wt	wt
000015	wt	GGC
000025	TAC	wt
990113	TTC	wt
020064	TTC	AAC
990102	TTC	TAC

2) サイクリングプローブ法を用いた *gyrA* 遺伝子変異の検出法の開発

サイクリングプローブ法は DNA と RNA のハイブリットプローブに蛍光物質とクエンチャーを付加したプローブをリアルタイム PCR 法に用いることにより点変異を検出する方法である。点変異部位を RNA 1 塩基に置き換えた DNA-RNA プローブが変異部位 (DNA) とアニーリングすると DNA-RNA 結合に特異的なヌクレアーゼ RNaseH がその部位を切断し、クエンチャーが蛍光物質と切り離されることにより蛍光を発する。PCR により変異部位を含む DNA 断片は増幅されるため、PCR サイクルが増加する毎に蛍光シグナルも増加し、微量の *gyrA* 変異遺伝子が短時間で検出できることとなる (図 1)。

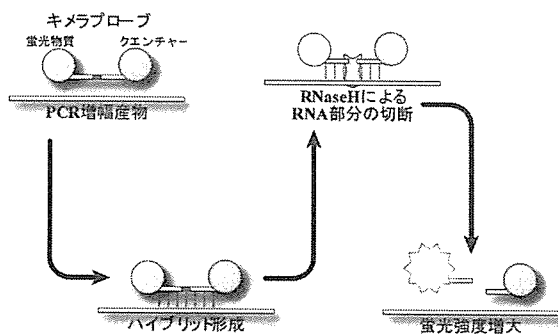


図 1 サイクリングプローブ法の原理

a) 検出プローブ

以下の FAM もしくは ROX 蛍光色素でラベルしたプローブを用意した。

i. コドン 83 用

野生型	Wild83 probe (FAM 標識)
TTC 変異	Mutant83 TTC probe (FAM 標識)
TAC 変異	Mutant83 TAC probe (ROX 標識)

ii. コドン 87 用

野生型	Wild87 probe (ROX 標識)
TAC 変異	Mutant87 TAC probe (FAM 標識)
AAC 変異	Mutant87 AAC probe (ROX 標識)
GGC 変異	Mutant87 GGC probe (FAM 標識)

b) 反応液組成

CleavePCR Core Kit (Takara Bio)を用いて以下の反応液を調製した。

10X CleavePCR Buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture(2.5mM each)	3 μ l
Mg ²⁺ solution (25mM)	5 μ l
Primer Mix (15 μ M)	0.3 μ l
Probe (FAM) (10 μ M)	0.5 μ l
Probe (ROX)(10 μ M)	0.5 μ l
Tli RNase HII (200U/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq HS (5U/ μ l)	0.25 μ l
dH ₂ O	10.45 μ l
template DNA (0.1~1pg)	2 μ l

c) 反応条件と検出

PCRの反応とシグナルの検出は Smart Cycler System (Takara Bio) を用いて以下の条件で行なった。

95°C	20sec	} 40 cycles
95°C	15sec	
55°C	20sec	
72°C	10sec	

C. 研究結果

本研究では、サイクリングプローブ法を用いたニューキノロン耐性菌を迅速診断法として開発した。この方法は、ニューキノロン剤の感受性を決定している DNA ジャイレース (*gyrA*) のキノロン耐性決定領域に含まれる点突然変異の場所 (83 番, 87 番) を特定する方法である。

検出用の蛍光色素が 2 種しか使用できないため、図 2 のストラテジーにより最終変異を同定するまでは 2 段階のステップで同定するようにした。

サイクリングプローブ法を用いて表 1 にある *gyrA* 遺伝子に変異の検出を検証した。*gyrA* 遺伝子のコドン 83 番目が野生型である Ty2 と 00015、コドン 87 番目が野生型の 990113、990102、Ty2 は陽性反応が検出された (図 3A, B)。この時点で Ty2 はニューキノロンに感受性であることが判明した。さらに *gyrA* 遺伝子の変異を特定するために他のプローブを用いて 2 次スクリーニングを行なった結果、すべての変異を持つ株にのみ特異的に陽性反応が検出されることが明らかとなった (表 1 と図 3C ~G 参照)。以上の結果からこの方法により選択分離培地上にコロニーが発育してから、ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌株のスクリーニングをわずか 1 時間程度の短時間ですることができた。

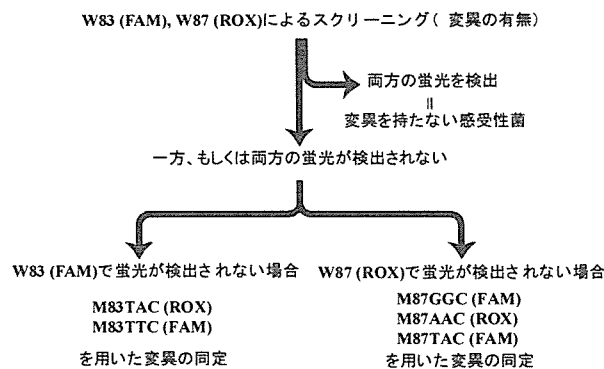


図 2. サイクリングプローブ法による *gyrA* 遺伝子変異の同定手順

D. 考察

バイオテロリズムでサルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌 O157 などの食品や水で媒介される病原体が現実使用される可能性は少ないと考えられる。しかしながら、これらの腸管

病原性細菌は比較的入手が簡単であるためバイオテロに使用される可能性は捨てきれない。また、腸内細菌は遺伝子組み換えが比較的容易にできるために、遺伝子組み換えなどの手法で腸内細菌に薬剤耐性遺伝子や病原性を増強するような遺伝子を組み込んだ細菌を作製しバイオテロに使用される可能性も考えられる。このようなことから、本研究のような薬剤耐性菌の迅速なスクリーニング法は、耐性遺伝子を調べることで容易に薬剤の感受性が判定でき従来の培養方法よりはるかに短時間で判定できる方法であるため、感受性の判定に緊急性を要するときに非常に有用であると考えられる。また、この成果は、腸チフス・パラチフス治療においても、適切な抗生物質の選択に大いに貢献できると考えられる。

E. 結論

サイクリングプローブ法を用いたバイオテロ発生時に採取されたチフス菌・パラチフス A 菌株のニューキノロン耐性の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

- 1) Morita M, Ito K, Hirose K, Takahashi H, Shimuta K, Terajima J, Ohnishi M, Harada M, Matsuzaki M, Watanabe H, Izumiya H: Development of a Real-time PCR assay for detection of *gyrA* mutations associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A. *Microbiol Immunol* 50: 707-711, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

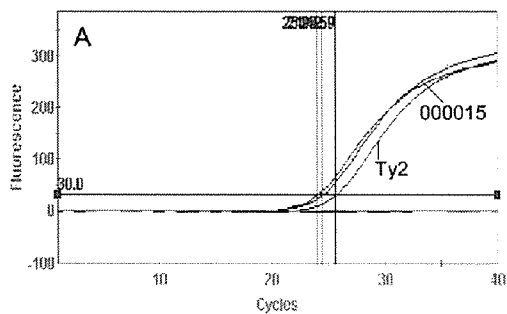
1. 特許取得

なし

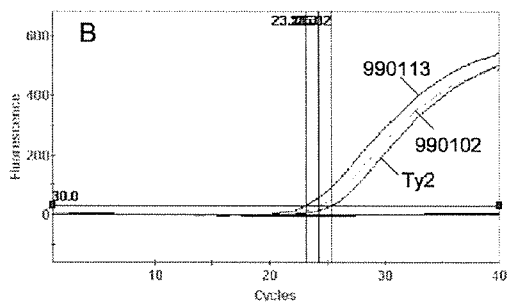
2. 実用新案登録

なし

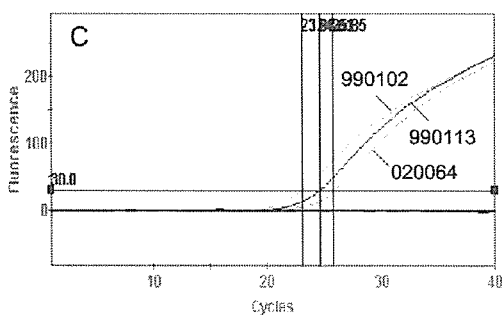
A) Wild83 probe (FAM label)



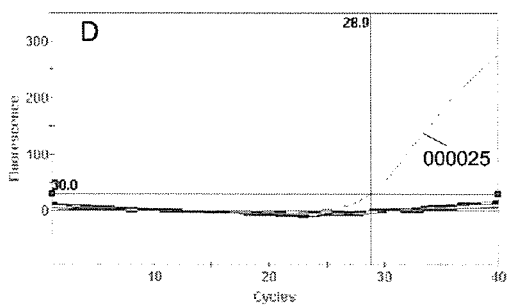
B) Wild87 probe(ROX label)



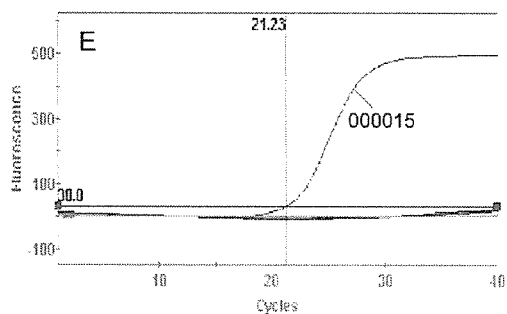
C) Mutant83 TTC probe (FAM label)



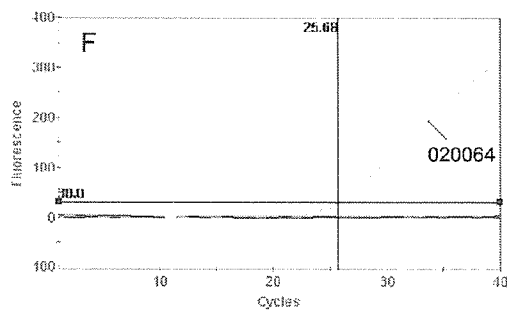
D) Mutant83 TAC probe (ROX label)



E) Mutant87 GGC probe (FAM label)



F) Mutant87 AAC probe (ROX label)



G) Mutant87 TAC probe (FAM label)

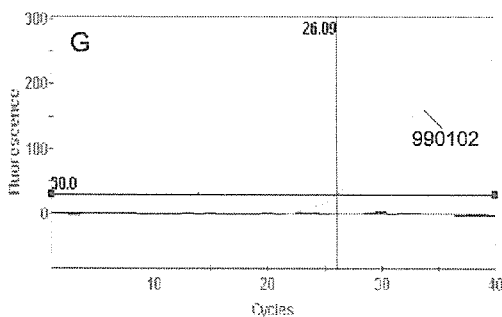


図3 サイクリングプローブ法を用いた *gyrA* 遺伝子変異の同定

7. 細菌毒素クロストリジウム属菌、ブドウ球菌、VERO 毒素

分担研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第2部

研究協力者 向本雅郁 (大阪府立大学)、杉山純一 (デンカ生研)

研究要旨 *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) と *C. septicum* 毒素(AT) 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基礎データとなるサンドイッチ ELISA 検出系における試薬の条件検討を行った。SEB および AT 両毒素検出系とも固層化抗体にはモノクローナル抗体、検出抗体にはビオチン標識ポリクローナル抗体で最も高感度の結果が得られた。検出感度は SEB で 200 ng/ml、AT で 100 ng/ml であった。この結果より、イムノクロマト法による SEB、AT の検出系が作製可能であり、十分実用化できることが明らかとなった。なお、前研究班で作製したボツリヌス毒素検出用ラッセクス凝集反応キットを用いて、乳児ボツリヌス患者便および不法輸入ボツリヌス毒素医薬品の検査で早期かつ簡易に陽性結果が得られたため、本年度追加製造を開始した。

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(AT) に対する早期診断法としてイムノクロマト法の開発を行う。本年度は、サンドイッチ ELISA 法での検出系を指標に、両毒素のイムノクロマト法による検出系に用いる試薬の選別と反応条件を確定した。

B. 研究方法

1) 抗体の調製

昨年度作製した抗 SEB ウサギ血清を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。抗原に His-Tag 融合 SEB (rSEB) を用いたため、His-Tag に対する抗体を除去するため、rSEB をカップリングしたアフィニティークラムで精製後、His-Tag アフィニティークラムで抗 His-Tag IgG を吸収することで SEB にのみ反応するアフィニティー精製 IgG を調製した。

抗 SEB および抗 AT モノクローナル抗体の選別を行った。評価基準として複数個のハイブリドーマクローンについて、ELISA において反応性が高く、エピトープの異なる 2 クローンをそれぞれ選別した (SEB; Clone No.1A4, 18E8 AT; Clone No.7E8, 9A5)。

2) サンドイッチ ELISA の構築

a) 検出抗体: SEB および AT 両検出系とも、固層化抗体はモノクローナル抗体を、検出抗体にはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方を用いた。モノクローナル抗体はハイブリドーマの無血清培養上清を protein G アフィニティークラムで精製した。ポリクローナル抗体はアフィニティー精製 IgG を用いた。

b) ビオチン標識抗体: 検出抗体の一部は EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC- Biotin (PIERCE) を用いてビオチンを標識した。方法は添付マニュアルに準拠した。

c) SEB および AT: 昨年度作製した大腸菌で発現させた精製組換え毒素 (rSEB および rAT) を用いた。

d) サンドイッチ ELISA の反応条件: ELISA プレートは研究協力者がこれまで構築したサンドイッチ ELISA において、良好な結果を得られている COSTAR9018 EIA/RIA Plate を用いた。検出抗体 (濃度は今回検討) を PBS で希釈し、各ウエルに 100 μ l ずつ加え、4°C 1 晩静

置した。ブロッキング液（今回検討）を各ウエル 300 μ l ずつ加え、37°C で 2 時間反応させた。PB (pH7.0) で希釈した精製 rSEB および rAT (1, 0.1 μ g/ml) を 100 μ l ずつ 2 ウエルに加え、37°C 2 時間反応させた。ビオチン標識あるいはペルオキシダーゼ標識検出抗体を各ウエルに 100 μ l ずつ加え、37°C、1 時間反応させた。ビオチン標識抗体の時には、さらにアビジン標識 POD (1:5000、Capell) を 100 μ l ずつ加え 37°C、0.5 時間反応させた。反応基質は *o*-フェニレンジアミン (0.4 mg/ml, ナカライ) を各ウエル 150 μ l ずつ加え、37°C で 0.5 時間反応させ、5N 硫酸 (0.05 ml) で反応を停止させた後、波長 490nm で各ウエルの吸光度を測定した。尚、各反応間には PBS-0.05%、Tween20 で 5 回ウエルの洗浄を行った。

e) ボツリヌス毒素検出用キットの評価と追加製造：前研究班（平成 14-16 年度）で作製したボツリヌス毒素検出用キットは、テロ発生時の有用性を確認するモデルとして、食餌性また

は乳児ボツリヌス発生時に評価するために国内数カ所の地方衛生研究所に配付した。本年度、異なる衛研で検査対象検体の検査の検査がおこなわれ、その評価が可能となった。

（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) ブロッキング試薬の検討

牛血清アルブミン・フラクシオン V (BSA, Sigma)、skim milk (Difco)、Blocking ONE (ナカライ) から、非特異反応の抑制程度と検出感度を評価基準として、ブロッキング試薬として用いる試薬の種類及び濃度を決定した。その結果、表 1 に示すように、SEB においては 1% skim milk が非特異反応の抑制および検出感度の両面から総合的に評価して、最も優れていた。AT においては 3%BSA が優れていた。

表 1. ブロッキング試薬の検討

SEB (μ g/ml)	BSA (%)			Skim milk (%)			Blocking ONE
	0.5	1.0	3.0	1.0	3.0	5.0	
0	0.214 *	0.185	0.115	0.023	0.035	0.018	0.235
0.1	0.777	0.694	0.502	0.431	0.415	0.315	0.891
1.0	1.513	1.432	1.425	1.298	1.194	0.943	1.776

AT (μ g/ml)	BSA (%)			Skim milk (%)			Blocking ONE
	0.5	1.0	3.0	1.0	3.0	5.0	
0	0.125	0.095	0.035	0.093	0.032	0.025	0.182
0.1	0.834	0.534	0.402	0.689	0.324	0.232	1.225
1.0	1.886	1.429	1.295	1.668	1.084	0.725	1.565

* 3~4回行った平均値(OD₄₉₀)

2) 固層化抗体および検出抗体濃度の決定

固層化抗体および検出抗体をそれぞれ 5,10,20,40,80 μ g/ml に PBS で希釈し、各濃度の組み合わせによる吸光度を測定し評価した(表 2)。検出抗体はモノクローナル抗体(モノモノ)とポリクローナル抗体(モノポリ)の両方で評価した。SEB においては固層化抗体は 40 μ g/ml 以上で、ビオチン標識検出抗体においては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれにおいても 10 μ g/ml 以上で高い OD

値が得られた。抗体使用のコストの面も考慮して、SEB 検出系では、サンドイッチ ELISA に用いる抗体の組み合わせは、モノモノ、モノポリのいずれにおいても固層化抗体 40 μ g/ml、検出抗体 10 μ g/ml とした。

AT においては、固層化抗体 5 μ g/ml 以上、検出抗体は 20 μ g/ml 以上で OD 値として良好な結果が得られた。したがって、AT 検出系では固層化抗体 5 μ g/ml、検出抗体 20 μ g/ml とした。

1) SEB 表2. 固層化抗体とビオチン標識検出抗体の濃度検討

検出抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	固層化抗体(ポリクローナル抗体)($\mu\text{g/ml}$)					検出抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	固層化抗体(モノクローナル抗体)($\mu\text{g/ml}$)				
	80	40	20	10	5		80	40	20	10	5
80	1.665*	1.569	1.321	1.271	1.294	80	0.951	0.869	0.739	0.555	0.518
40	1.512	1.581	1.418	1.303	1.255	40	0.933	0.772	0.691	0.524	0.502
20	1.391	1.376	1.885	1.884	1.862	20	0.912	0.741	0.645	0.495	0.491
10	1.412	1.396	1.036	0.985	0.916	10	0.763	0.725	0.543	0.412	0.399
5	0.981	0.945	0.913	0.899	0.889	5	0.531	0.499	0.472	0.366	0.313

* 3回行った平均値(OD₄₉₀)

2) AT

検出抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	固層化抗体(ポリクローナル抗体)($\mu\text{g/ml}$)					検出抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	固層化抗体(モノクローナル抗体)($\mu\text{g/ml}$)				
	80	40	20	10	5		80	40	20	10	5
80	2.138	2.056	1.976	1.925	1.934	80	1.254	1.102	1.046	1.023	1.056
40	2.096	1.941	1.951	1.932	1.912	40	1.145	1.035	0.988	0.945	0.936
20	2.135	1.965	1.885	1.884	1.862	20	1.024	0.991	1.031	0.902	0.895
10	1.489	1.446	1.389	1.237	1.256	10	0.914	0.862	0.751	0.745	0.725
5	1.098	0.995	0.997	0.922	0.835	5	0.692	0.635	0.654	0.623	0.666

3) サンドイッチ ELISA による SEA および AT の検出感度

rSEB および rAT を 1~1,000 ng/ml まで PB で 2 倍階段希釈した試料を用いて、構築したサンドイッチ ELISA での検出感度を調べた。SEB では、モノーポリの組み合わせでは検出限界はビオチン標識と POD 標識のどちらの検出抗体においても 200 ng/ml であった (図 1a)。モノーモノでは固層化抗体が 18E6 の場合 250 ng/ml、1A4 の場合 500 ng/ml が検出限界であり、このことから、18E6 を固層化抗体、1A4 をビオチン化検出抗体とした方が良好な結果が得られることがわかった (図 1b)。rAT 検出系においては、モノーポリで、ビオチン標識、POD 標識のいずれにおいても検出限界は 100 ng/ml であり、抗原として細菌培養から調製した毒素を用いた場合も検出感度には違いはなかった (図 2a)。モノーモノの系では、固層化抗体の違いによる差はなく、いずれのクローンを用いた場合も検出限界は 500 ng/ml であった (図 2b)。

4) ボツリヌス毒素検出用キットの評価と追加製造

国内で発生した 2 例の乳児ボツリヌス症(大阪府: B 型毒素と宮城県: A 型毒素)患者便中から特異的に各毒素を検出した。また、海外から持ち込まれたボツリヌス毒素製剤を疑う標品について検査した結果、A 型毒素であることを早期に、特異的に検出した。この結果を踏まえ、今年度からボツリヌスレファレンスセンターが発足したため、現在参加している 23 機関へ配付するために、追加製造を開始した。

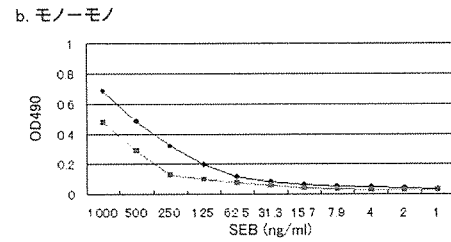
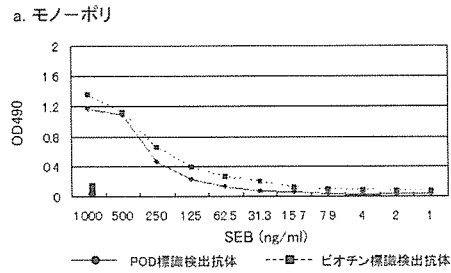


図1. サンドイッチELISAによるSEBの検出感度

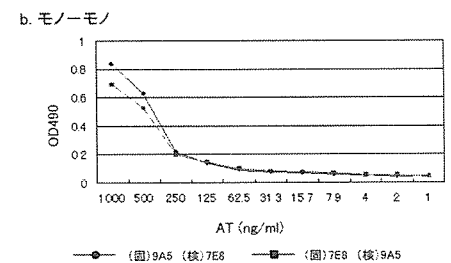
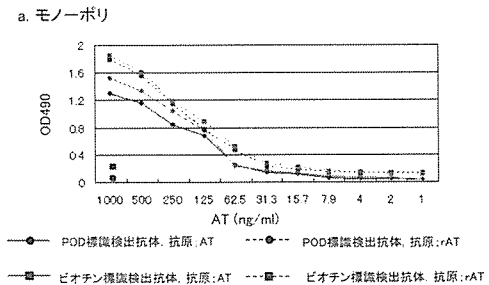


図2. サンドイッチELISAによるATの検出感度