

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 μ l 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、2 週間ごと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、全 8 回の免疫を行い、最終免疫の 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 $^{\circ}$ 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、1,000、10,000 倍に希釈された 3 種の血清を 1 次抗体として、100 μ l 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 450nm の波長で吸光度を測定した。

2) 抗 NiV-N, P 血清の反応性解析（NiV 感染細胞に対する IFA）

昨年度作製した抗 NiV-N, P 血清（rabbit anti-NiV-N1, N2, P1）を用いて、以下の方法で NiV 感染細胞に対する IFA を行い、反応性を解析した。

96 穴プレート上の Vero 細胞に m.o.i=0.1 の NiV を接種した。24 時間後に培地を除去し、PBS で洗浄後、冷メタノールで 10 分固定し、乾燥した。被検血清を 1:10 希釈より 2 倍階段希釈を行い、100 μ l 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 2 次抗体（FITC 抗ウサギ IgG）を 70 μ l 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。2 次抗体液には、核染色を行うため DAPI を加えた。

上記ウイルス接種から固定までは、豪州家畜衛生研究所（AAHL）BSL4 施設にて、IFA は同 BSL3 施設にて行った。

3) 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（＝「NiV-N 発現プレート」）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 100ng を 25 μ l の無血清 MEM に溶解し、Lipofectemine 2000（Invitrogen）0.5 μ l を含む無血清 MEM25 μ l 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。

NiV 感染細胞（＝NiV 感染プレート）については、上記 2）と同様に作製、固定を行った。

「NiV-N 発現プレート」「NiV 感染プレート」に対して、以下の方法で IFA を行った。PBS で階段希釈した血清を 70 μ l ずつ各ウェルに添加し、1 時間反応させた。PBS で洗浄後、被検血清の動物種ごとに異なる 2 次抗体液（表 2 参照）を 70 μ l 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-F, G 蛋白質ウサギ抗血清の作製

ELISA による、経過血清の抗体価の推移を図 1A, B に示した。全てのウサギについて、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、および昨年度作製した抗 NiV-N, P 血清の抗体価もあわせて示した。今回得られた血清はすべて、既存の陽性対照を上回るか同等の抗体価を

示したほか、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) 抗 NiV-N, P 血清の反応性解析 (NiV 感染細胞に対する IFA)

Vero 細胞に NiV を感染させたところ、2 日後には、光学顕微鏡の観察で、特徴的な多核巨細胞の形成が確認された。蛍光顕微鏡の観察では、複数個の蛍光領域が認められ、蛍光強度は血清濃度に依存していた。この蛍光領域は、DAPI 染色像で認められた多核巨細胞の分布と一致していることから、NiV 感染細胞と考えられた。血清 N1, N2, P1 における検出限界は、それぞれ 1:1,280、1:1,280、1:2,560 であった。一方、陽性対照に用いた AAHL 所有の抗 NiV ウサギ抗血清、抗ヘンドラウイルス (HeV) 抗血清の検出限界は、それぞれ 1:20,480、1:5,120 であった。

3) NiV-N 蛋白発現細胞を用いた抗体検出 IFA の確立

ウサギ、ヒト、実験動物ブタ、野外ブタ、ウマ、オオコウモリ血清を用いて、「NiV-N 発現プレート」「NiV 感染プレート」に対して IFA を行った結果を表 2 に示した。

ウサギ、実験動物ブタ、ウマの血清については、「NiV-N 発現プレート」と「NiV 感染プレート」の結果は概ね一致していたが、その他の動物血清については、両プレート間の結果に相違が認められた検体があった。

D. 考 察

現在、当研究室で可能な 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。このうち、バイオテロ疑い事例の発生時には、特異性の高い抗原検出法の選択肢をなるべく多く確保することが急務である。

本年は、まず抗原検出用血清を大量に確保する目的で、DNA 免疫により、抗 NiV-F, G 蛋白抗ウサギ血清を作製した。経時血清の抗体価確

認としては、抗体検出 ELISA を行い、同時に同 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、我々が行っている 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。表 1 に示すとおり、今回作製された抗血清はいずれも、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、全てこれを上回るか同等の反応性を示した他、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。この非特異反応の低さは、免疫原として DNA を用いたためと考えられる。今後、これらの血清が、NiV 感染細胞における抗原検出用血清、あるいは NiV 抗原検出 capture ELISA における抗原 capture 用血清として利用できるかについて解析を行う。同時に、中和抗体の有無を確認し、中和試験における陽性対照血清として使用できるかについても検討を加える。

続いて、昨年度作製した NiV-N, P 抗血清について、NiV 感染細胞における抗原検出系に使用した際の反応性を解析した。結果に示したとおり、昨年度作製した 3 種の抗血清の検出限界は、AAHL 所有の NiV, HeV 感染血清に比べて、低いものであった。しかし、検出限界以上の濃度では、特異的な蛍光を観察することが可能であり、DAPI による核染色、およびエバンスブルーによるカウンターステインとともに行うことで、十分診断に耐えうると考えられた。ウイルス感染血清と比較して、検出限界が低いのは、免疫源としてプラスミド DNA を利用したためと考えられる。しかし、発現蛋白を免疫源に用いることで、非特異反応が高まる可能性を考慮すると、感染性ウイルスを使用できないわが国の現状では、DNA 免疫は有効な免疫法として期待できる。

最後に、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 (「NiV-N 発現プレート」) を、NiV 感染細胞を用いた IFA (「NiV 感染プレート」) と比較した。表 2 に示すとおり、実験動物では両法の結果は概ね一致していたが、野生 (あるいは野外の)

動物では結果に相違が認められた。NiV 非感染の野外ブタ（マレーシア産）でも「NiV-N 発現プレート」で非特異反応が認められた一方で、豪州産の野外ブタ血清プールでは非特異反応は抑えられていることから、同じ動物種でも飼養環境によって非特異反応の高さが異なると考えられた。今後、非特異反応を抑制するために、種特異的な 2 次血清の使用や、ブロッキング剤の導入を検討する必要がある。また全体的に、使用できる血清数が少なく、ヒト血清については、HeV 陽性 1 種、陰性 2 種に限られていた。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。

E. 結 論

NiV 抗原検出系に利用するための抗血清を大量に確保する目的で、NiV-F, G 蛋白に対するウサギ抗血清を作製した。抗体価確認のために行った ELISA では、現在、陽性対照血清として使用している抗 NiV ブタ血清と比較して、反応性・特異性がきわめて良好であることから、ELISA 陽性対照血清としても使用可能であることが確認された。今後、NiV 抗原検出系における反応性を解析する。

昨年度作製したウサギ抗 N, P 蛋白質抗血清は、NiV 感染細胞に対する抗原検出 IFA に利用できることが確認された。

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

特になし

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

4. バイオテロを想定したリケッチアの検出法と診断に関する研究

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 室長

協力研究者 安藤秀二、坂田明子、花岡 希 (感染研・ウイルス第1部第5室)

研究要旨：リケッチアはバイオテロに使用される可能性が指摘されている病原体である。そこでバイオテロにリケッチアが用いられた場合の迅速検出系として、Taqman MGB プローブを用いた Spotted fever group に共通した検出系を開発した。加えて、ロッキー山紅斑熱の病原体 *R. rickettsii*、発疹チフスの *R. prowazekii*、日本紅斑熱の *R. japonica* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した。本検出法は、これまでのところ感度、特異性に優れ、通常の Real time PCR 系の検出時間よりも迅速であることから、バイオテロが想定される不明熱患者発生時における、有用な原因菌同定法になり得ると考えられる。今後は、実際のリケッチア感染症患者の検体での検証を行ない、実用化を進める予定である。

A. 研究目的

リケッチア感染症は世界中でみられ、診断や治療の遅れで重篤になり得る重要な疾患であるが、患者発生時における高感度かつ迅速な診断方法は確立されていない。テロ行為に本菌種が使用された場合、早急な菌種同定が求められるが、現状では対応に困難が生じる可能性が高い。そこで本研究ではリケッチアがバイオテロとして用いられた場合を想定し、患者検体や原因が推定される検体からの迅速かつ特異的な同定法の開発を目指した。

本年度はリケッチアの中でも、特に有用な診断ツールの開発が遅れている Spotted fever group を広範囲に検出する系と、主に欧米で問題となっているロッキー山紅斑熱の病原体 *Rickettsia rickettsii* と、わが国では永年発生のない発疹チフスの *R. prowazeki*、我が国やアジア地域において問題となっている紅斑熱として日本紅斑熱リケッチア *R. japonica* を特異的に検出できる系の開発を目指した。また、検出法としては、将来他の病原菌検出をも視野に入れた検出法への発展性を考慮し、信頼性が高く今後より迅速かつ簡便な診断系開発が期待できる、Applied biosystems 社の Taqman MGB プロー

ブ技術の応用を試みた。

B. 研究方法

材料と方法：

ゲノム DNA は *R. rickettsii*、*R. prowazekii*、*R. japonica*、*R. conorii* を用いた。*R. rickettsii* 及び *R. prowazekii* は抗原スライドから、PUREGENE DNA Purification Kit[Gentra Systems]を用いて DNA を抽出した。*R. japonica* 及び *R. conorii* はマウス L929 細胞を用いて増殖後、ホルマリンで不活化した宿主細胞から同様に PUREGENE DNA Purification Kit[Gentra Systems]を用いて DNA を抽出した。(各 DNA とともに宿主 DNA を含んでいる。)

Taqman MGB probe 作製のために、*Rickettsiae* 属の中から解析の進んでいる *R. rickettsii*、*R. conorii*、*R. africae* 等のゲノム情報を元に、特に Spotted fever group (紅斑熱群) に共通する遺伝子部位を検討した。また、*R. rickettsii* や *R. prowazekii*、*R. japonica* について、各々の菌種に特異的な遺伝子配列部位を検討した。抽出した DNA 配列を元に、Primer express software[ABI]を用いて、プライマー配列及びプローブ配列部位を検索し、特異性の高い最適なプライマーセッ

トを選出した。これら各ターゲット配列はヒトやマウスには存在しないORFをターゲットとした。蛍光物質として、Spotted fever group 検出プローブには VIC を、その他の特異的検出プローブでは FAM を用いた。

(*ターゲット配列及びプローブ・プライマー配列は非公開)

R. rickettsii, *R. prowazekii*, *R. japonica*, *R. conorii* ゲノム DNA を用いて、作製したプライマーセットの有用性を、Ex premix taq(Perfect Real Time)[TAKARA]の酵素を用いて、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムで解析した。反応組成は、表 1 に示した。反応サイクルは Ex premix taq(Perfect Real Time)[TAKARA]に添付されたプロトコルに従い、Stage 1 : 初期変性 (95°Cで 20 秒)、Stage 2 : PCR 反応 (95°Cで 5 秒反応後、60°Cで 34 秒) で Stage2 を 40 回繰り返す反応サイクルを設定した。

Spotted fever group 及び *R. prowazekii* を各々特異的に、ひとつの反応内で見分けることができるかを検討するために、二つのプライマー濃度を設定した (表 2、3)。PCR 反応サイクルは上記と同様である。また、従来の PCR 法を用いた菌同定方法[6]の反応組成を表 3 に示す。反応時間は、Stage 1 : 初期変性 (94°Cで 30 秒)、Stage 2 : PCR 反応 (94°Cで 30 秒反応後、52°Cで 30 秒、72°Cで 30 秒) で Stage2 を 30 回繰り返した後に、72°C3 分反応させた。使用した酵素は La taq[TAKARA]である。

C. 研究結果

Spotted fever group の検出を目的としたターゲット配列には、*Rickettsiae*によく保存されている *ompA* を用いた。*R. rickettsii* の *ompA* 配列については、現在公開されている完全長ゲノム配列情報 (ヒトやマウスを含む) に対して Blast 検索を行なった (図 1)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)。その結果から、*Rickettsia* Spp.に保存性の高い上流約 500bp に着目し (図 2)、Primer express ソフトウェアを用いて、Taqman

MGB probe 及びプライマーセットを作製した。同様に、*R. rickettsii* や *R. prowazekii*、*R. japonica* について、各々の菌種に特異的な遺伝子配列部位を見出し、プライマー及び Taqman MGB プローブを作製した (データ非公表)。

R. rickettsii を特異的に検出するプライマープローブセットでの検出では *R. rickettsii* にもみ特異的な増幅が認められた。(図 3) さらに、DNA 濃度を 10 倍希釈に 3 段階で希釈系列を作製した場合に各々正確に検出できていることを確認した (図 3 左上)。また、No template control(NTC)では増幅が認められなかった。以上のことから、今回開発したプライマーセットは *R. rickettsii* を特異的に検出できることが明らかとなった。

また、*R. japonica*、*R. prowazekii* でも同様の実験を行い、各々特異的に検出できるプライマーセットを開発した (データ非公表)。Spotted fever group 検出用プライマーセットを用いた実験では、*R. rickettsii*、*R. japonica*、*R. conorii* で特異的な反応が認められ、一方 *R. prowazekii* では反応が認められなかった (図 4)。また NTC での反応性も無かったことから、Spotted fever group を特異的に検出可能な検出系であると確認できた。

Spotted fever group 及び *R. prowazekii* の同時検出系では、*R. rickettsii* と *R. priowazekii* の DNA を指標にして実験を行った。*R. rickettsii* DNA を検出した場合と *R. priowazekii* DNA を検出した場合では、各々目的とする DNA 断片の増幅が認められ、二つのプローブを混合した反応系で各々の DNA が特異的に検出できることがわかった。また、蛍光強度に差はあったものの、反応組成表 1、2 共に大きな検出効率の差は認められなかった (図 5)。

検出効率に関して、従来の PCR 法を用いた検出系と比較を行った。表 2 の反応系を用いて、*R. rickettsii* DNA を 10 倍希釈で 4 段階希釈系列を作製し Template として用いて、検討した。DNA 量を分光高度計 (ND-1000 Spectrophotometer[NanoDrop])を用

いて測定したところ、希釈一段階目の濃度が約 1ng であり各 DNA 濃度は①1ng、②100pg、③10pg、④1pg であった（宿主 DNA を含んでいる）（図 6）。なお Real Time PCR 反応サイクルはテンプレート量を考慮し 60 サイクルに設定して行った。従来の検出方法では、図 6 の③の段階でバンドが認められなかった。一方、新規に開発した Taqman MGB プローブを用いた検出法では、1000 倍希釈（図 6-④）でも増幅が認められた。また、*R. prowazekii* を検出するプローブ蛍光（図 6 赤）は、全く反応していないことが確認できた。以上から、本研究によって開発された、新しい検出系は従来のものと比較して、100 倍程度感度がよく、リケッチア間での特異性も高いことがわかった。

D. 考察

Taqman MGB プローブを用いて、Spotted fever group に共通した迅速かつ簡便な検出系を開発した。加えて、*R. rickettsii*、*R. japonica*、*R. prowazekii* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した。検出感度は従来の PCR 法と比較し、少なくとも 100 程度高感度であった。Spotted fever group 検出系と *R. prowazekii* 特異的検出系をひとつの反応系で検出でき、各々の検出系はすべて、同等の PCR 反応性を有していた。また、本検出法は通常 Real time PCR 系の検出時間よりも早く約 50 分で検出が可能であることから、不明熱患者発生時における、簡便かつ迅速な原因菌同定法と考えられる。

以上から、リケッチアによるバイオテロが想定される不明熱患者発生時における対応案を示す（図 7）。今後は各反応系が、何コピーまで、検出感度があるのかの精査が必要であり、実際の臨床サンプルを用いての感度の検討も必要である。また、Spotted fever group 検出系においては、他の *Rickettsiae* spp. に対する反応性の確認が必要である。

現在、Taqman MGB プローブを用いた、検出系は、Fast PCR 系と組み合わせること

によって、40 分以内での検出が可能となっている。今後はこの検出系に、本研究によって開発されたプライマーセット等を適応させれば、さらに迅速な検出が可能になることが期待される。また、本検出系は primer express software を使用して設計を行っているため、Fast PCR 系への応用が簡便に実行できるのも特徴である。

E. 結論

本年度はバイオテロにリケッチアが用いられた場合の迅速検出系として、Taqman MGB プローブを用いた Spotted fever group に共通した検出系を開発した。加えて、*R. rickettsii*、*R. japonica*、*R. prowazekii* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した。本検出法は、今後感度、特異性について、さらに詳細な検証がなされれば、通常 Real time PCR 系の検出時間よりも迅速であることから、バイオテロが想定される不明熱患者発生時における、有用な原因菌同定法になりうると考えられる。今後は、実際の検体での検証を行なう予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 発表論文
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
3. その他
なし

表 1

Real time PCR 反応組成

	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq (2×)	10 μ l	1×
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
TaqMan MGB (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
ROX Dye II*3 (50×)	0.4 μ l	1×
template	1.5 μ l	
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	6.9 μ l	
Total	20 μl	

表 2

一反応内での同時検出系 Real time PCR 反応組成

	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq (2×)	10 μ l	1×
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
TaqMan MGB (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
ROX Dye II*3 (50×)	0.4 μ l	1×
template	1.5 μ l	
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	6.9 μ l	
Total	20 μl	

表 3

従来の PCR 法反応組成

	使用量	最終濃度
LA PCR buffer (10×)	5 μ l	1×
Forward Primer (100 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (100 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
MgCl ₂ (25mM)	4 μ l	2.5mM
dNTPs (各2.5mM)	0.4 μ l	
template	1.5 μ l	
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	6.9 μ l	
Total	20 μl	

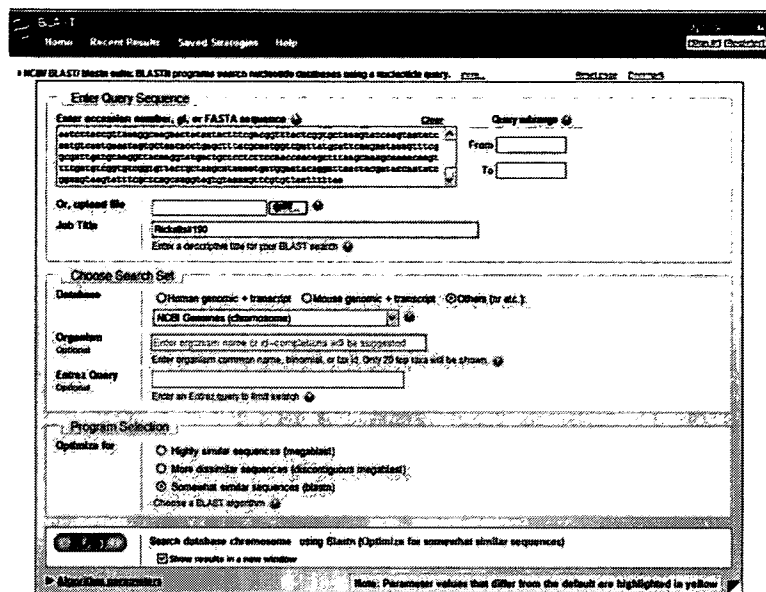


図 1

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi を用いて、*R. rickettsii* の *ompA* 遺伝子を blast するための、パラメーター設定。

ヒトやマウスを含む公開されているゲノム DNA 情報すべてに対して、Blast を行えるように設定した。

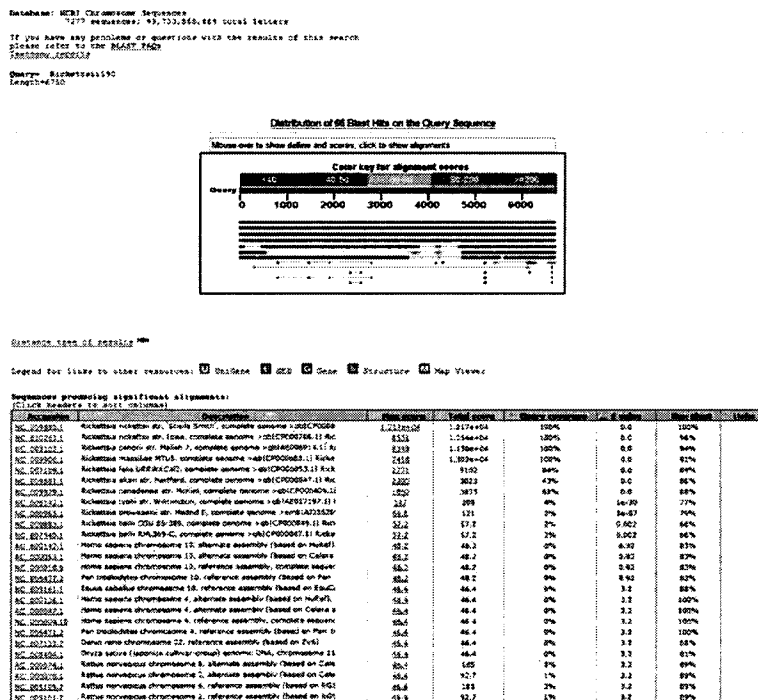


図 2

Blast 結果の図

図 1 において設定したパラメーターを用いて *R. rickettsii* の *ompA* 遺伝子を blast した結果である。各 *Rickettsia* に保存性の高い、上流領域にプライマーやプローブを作製した。

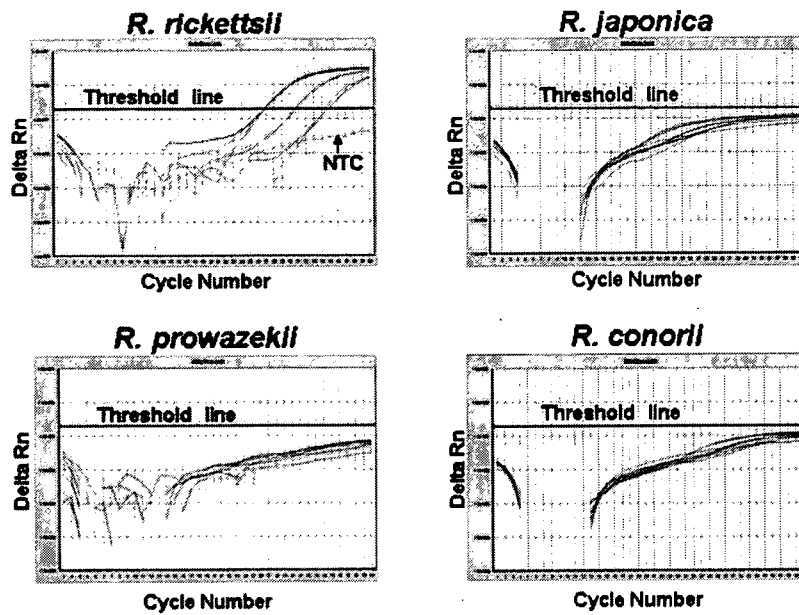


図 3

y 軸 (Delta Rn) はバックグラウンドの蛍光を差し引いた蛍光検出量を示し、横軸(Cycle Number)は PCR サイクル数を示している。Threshold line が示す蛍光強度で、サイクル数を求めた。各反応図の上には Template で用いた菌種である。図中左上の *R. rickettsii* のゲノム DNA をテンプレートにした時のみ対数的に検出できていることが認められた。NTC:No template control.

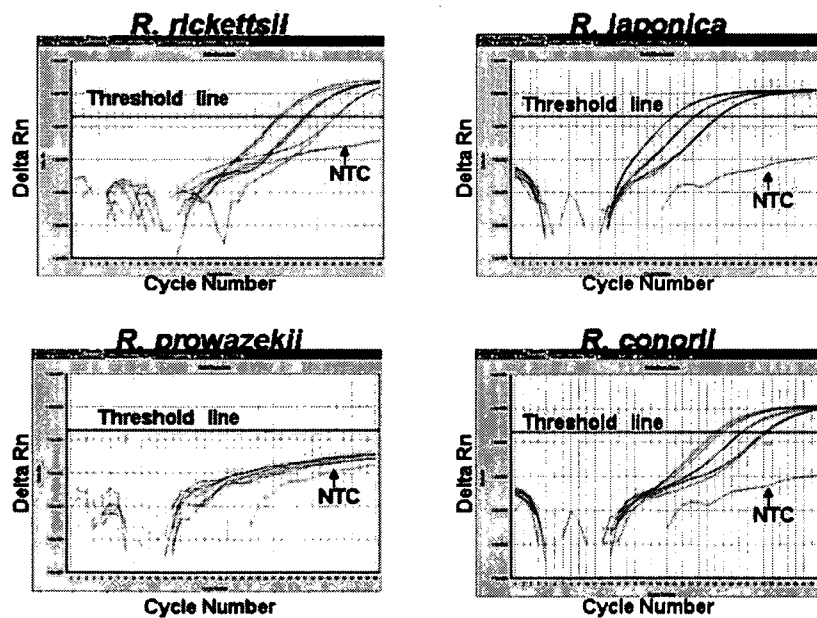
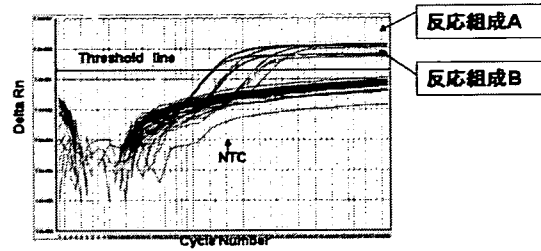


図 4

図 3 と同様に、y 軸 (Delta Rn) はバックグラウンドの蛍光を差し引いた蛍光検出量を示し、横軸(Cycle Number)は PCR サイクル数を示している。Threshold line が示す蛍光強度で、サイクル数を求めた。各反応図の上には Template で用いた菌種である。*R. rickettsii*、*R. japonica*、*R. conorii* のゲノム DNA をテンプレートにした時のみ対数的に検出できていることが認められた。NTC:No template control.

Spotted fever group(rickettsii, conorii, japonica)



R. prowazekii

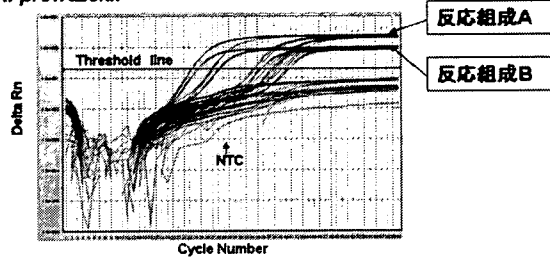


図 5

図 3 と同様に、y 軸 (Delta Rn) はバックグラウンドの蛍光を差し引いた蛍光検出量を示し、横軸(Cycle Number) は PCR サイクル数を示している。Threshold line が示す蛍光強度で、サイクル数を求めた。各反応図の上には示しているのは Template で用いた菌種である。

緑色の反応曲線は VIC の検出 (Spotted fever group) を赤色の反応曲線は FAM の検出 (*R. prowazekii*) を示している。

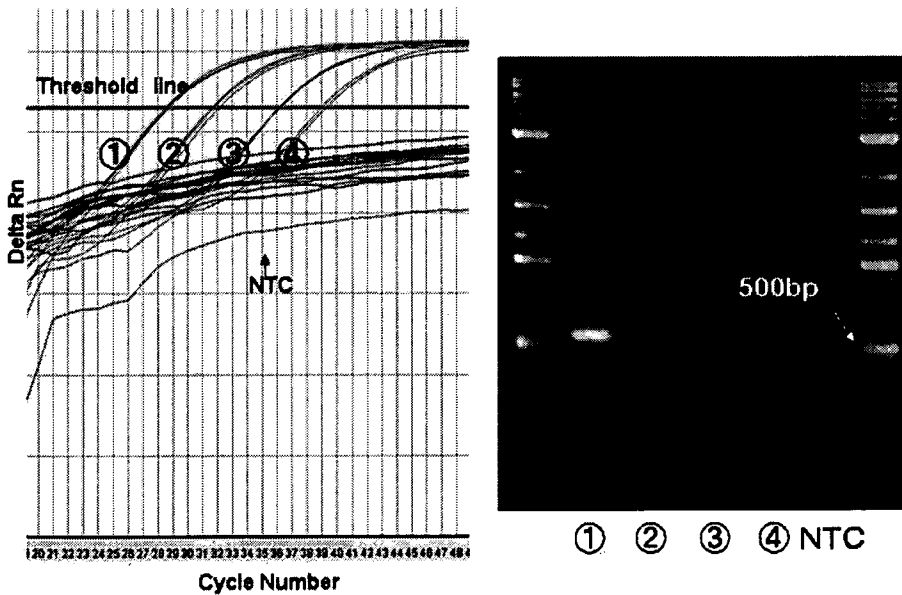


図 6

図 3 と同様に、y 軸 (Delta Rn) はバックグラウンドの蛍光を差し引いた蛍光検出量を示し、横軸(Cycle Number) は PCR サイクル数を示している。Threshold line が示す蛍光強度で、サイクル数を求めた。①1/10、②1/100、③1/1000、④1/10000 倍希釈を示している。赤色の増殖曲線は *R. prowazekii* を検出する Taqman MGB プローブの FAM 蛍光を示している。緑色の増殖曲線は Spotted fever group を検出する Taqman MGB プローブの VIC 蛍光を示している。

患者集団発生→リケッチア・コクシエラ症疑い→血餅及び皮膚組織からDNA抽出

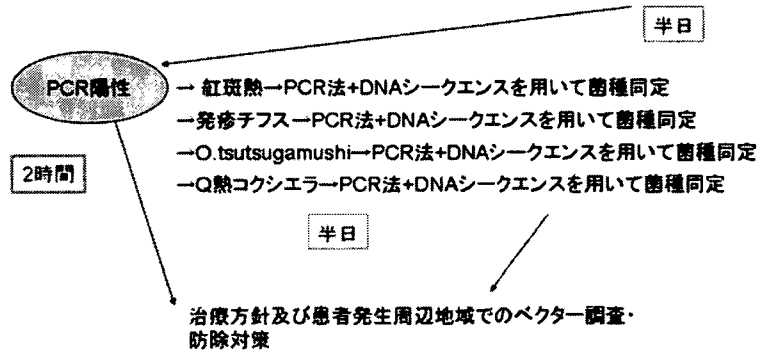


図 7

リケッチア・コクシエラ感染症が疑われるバイオテロ発生時における対応案。

本研究によって開発された Taqman MGB プローブ検出系を用いることにより、紅斑熱群や発疹チフス患者の特定を迅速かつ高感度で特定できる。

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、山崎 浩（感染研・寄生動物部）

研究要旨 社会不安を誘導することを目的として使用される可能性のある原虫類として、原発性アメーバ性髄膜脳炎（Primary Amoebic Meningoencephalitis）の起因アメーバ *Naegleria fowleri* の管理は重要である。*N. fowleri* は自由生活性アメーバで、高温の水環境に適応したアメーバとして知られている。患者は世界各地から報告されているものの、研究用に確立されたアメーバ株は限られている。自然界からのアメーバの分離、培地への順化など株の確立には相当の専門知識が必要で、不穏な目的に使用されるとすれば既存の株が使われる可能性が高いと考えられる。病原体の traceability を確保する目的で国内外の研究機関に保存・研究使用されている *N. fowleri* 主要株およびわが国の分離株の遺伝子解析を行い、それぞれの特異配列を明らかとした。

あわせて、昨年度より準備してきたアメーバ性脳炎の鑑別診断のため、病理組織切片から得た DNA を鋳型とした赤痢アメーバ検出用 PCR を用意し、病理組織標本を用いて *N. fowleri* およびそれ以外の計 4 種のアメーバの鑑別診断が可能となった。

A. 研究目的

社会不安を誘導することを目的として使用される可能性のある原虫類として、原発性アメーバ性髄膜脳炎（Primary Amoebic Meningoencephalitis : PAM）の起因アメーバである *Naegleria fowleri* および水道水汚染による大規模集団感染が懸念される *Cryptosporidium parvum* (genotype 1, 2) があげられる^(1,2)。前者の *N. fowleri* は自由生活性アメーバで、比較的高温の水環境に適応したアメーバとして知られている。患者は世界各地から報告されているが、研究用に確立されたアメーバ株は限られている。自然界からのアメーバの分離、培地への順化など株の確立には相当の専門知識が必要で、生物テロに使用が危惧されるとすれば既存の株が使われる可能性が高いと考えられる。そこで、当該研究では病原体の traceability を確保する目的で国内外の研究機関に保存されている *N. fowleri* 主要株およびわが国での分離株の遺伝子鑑別を行なった。具体的にはミトコンドリア DNA 上のある特定の遺伝子を用いて sub-typing を行い、鑑別点を整理した。

あわせて、昨年度より準備してきたアメーバ性脳炎の鑑別診断のため、病理組織切片から得た DNA を鋳型とした赤痢アメーバ検出用の PCR を用意した。

B. 研究方法

1) *Naegleria fowleri* の主要な既存株の遺伝子型別

N. fowleri は 6 株を使用した(表 1)。その他に、非病原性の *N. lovaniensis* の 2 株を用いた。*Naegleria* は有性生殖が行なわれないこと、ミトコンドリアは細胞当り複数個存在することから、標的とする遺伝子はミトコンドリア DNA 上の遺伝子とした。*N. fowleri* のミトコンドリア DNA の配列情報がないことから、近縁の *N. gruberi* (NC002573) および *Acanthamoeba* (NC001637) の登録配列より共通部分からプライマーを設計した。

PCR は定法に従って行うこととし、1kb 程度を増幅するプライマーセット、あるいは病理固定試料からの増幅を想定して複数の短い領域を Nested-PCR で増幅するプライマーセットを

用意した（非提示）。PCR 酵素は *Ex Taq* DNA polymerase (Hot start version, タカラバイオ) を使用した。プログラムは 94°C 5 分の後、94°C 30 秒 55°C 30 秒 72°C 30 秒の 35 サイクルとした。PCR 産物は定法に従い塩基配列決定を行った。得られた配列より Clustal W (BioEDIT) を用いてアライメントを作成した。配列の位置関係は *N. gruberi* の遺伝子配列をを参考にして特定した標的遺伝子の開始コドン +1 として計算した。系統樹の描画に MEGA4 を用いた。

2) パラフィン包埋切片からの DNA 抽出と PCR による赤痢アメーバの同定

表1 使用した株一覧

種	株	入手経路	分離場所	国別
<i>Naegleria fowleri</i>	Nf66	Dr. J. F. De Jonckhere	ヒト	オーストラリア
<i>N. fowleri</i>	KUL	Dr. J. F. De Jonckhere	ヒト髄液	ベルギー
<i>N. fowleri</i>	76/14/S3	ATCC30809	熱汚染された水路由来の沼	ベルギー
<i>N. fowleri</i>	Lee	ATCC30894	ヒト脳	USA
<i>N. fowleri</i>	Kurume	Dr. Fukuma	ヒト脳	日本
<i>N. fowleri</i>	6088	ATCC30893	ヒト	USA
<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D	Dr. F. Marciano-Cabral	魚水槽	ベルギー
<i>N. lovaniensis</i>	TS	ATCC30569	Vero細胞培養液	USA

赤痢アメーバ症患者の上行結腸病巣のパラフィン包埋切片 (10 μm 厚) 1 枚より、DEXPAT (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出した。すなわち、パラフィンを除去後、DEXPAT を組織上に滴下し、ピペット操作で組織を DEXPAT と共に剥離・回収 (500 μL) した。これを 1.5ml チューブに移し替え、100°C で 10 分間加熱し、その後に 4°C で 15,000rpm、10 分間で遠心分離し、上清を得た。PCR は定法に従って行った。SSU rDNA の一部領域 0.4kb を増幅するプライマーセット (非提示)、並びに peroxyredoxin 遺伝子の一部領域 0.1kb を増幅するプライマーセット (非提示) を用いた。両遺伝子の増幅には *Ex Taq* DNA polymerase (Hot start version, タカラバイオ) を用い、94C 60 sec, 59C 90 sec, 72C 90 sec, 30 cycles で行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて確認した。

予備的検討により上記の *N. fowleri* 6 株、および非病原種 2 株のミトコンドリア DNA 上の標的遺伝子の配列にはほとんど差異がないことを確認した。そこで、標的遺伝子の開始コドンの上流域の塩基配列に着目し、分別可能な配列を特定した (図 1)。その結果、株ごとに特有の配列が存在した (表 2)。すなわち、標的遺伝子の開始コドン +1 と規定すると、LEE 株では -227 の配列が A、76/14/S3 株では -94 配列が T、6088 株では -19 の配列が G、Nf66 株では -40 の配列が G、また、-106 から -61 に存在する繰り返し配列の欠損、Kurume 株では +1049 の配列が G となっておりそれぞれの株との分別が可

能であった。また、KUL 株については上述のような特異配列が認められなかったが、他の株が否定された後に -142 の配列が T、および -69 の配列が G となっていることを確認することで特定が可能となった。これら 6 株の配列の差異は僅かであったが、系統樹解析の結果を図 2 に示した。なお、*N. fowleri* と非病原種の *N. lovaniensis* との間では標的遺伝子の遺伝子配列の差異は明らかであった。

C. 研究結果

1) *Naegleria fowleri* の主要な既存株の遺伝子型別

```

      *      -280      *      -260      *      -240      *      -220
KUL-trnQ-c : ..... : 80
kurume-trn : ..... : 80
LEE-trnQ-c : .....A..... : 80
76/14/S3-t : ..... : 80
6088-trnQ- : ..... : 80
nf66-trnQ- : ..... : 80
Aq/9/1/45D : .....A..AC.....T : 45
TS-trnQ-co : .....A..AC.....T : 45

```

```

      *      -200      *      -180      *      -160      *      -140
KUL-trnQ-c : ..... : 160
kurume-trn : .....C..... : 160
LEE-trnQ-c : ..... : 160
76/14/S3-t : ..... : 160
6088-trnQ- : .....C..... : 160
nf66-trnQ- : .....C..... : 160
Aq/9/1/45D : G...T.CC..T...A.....A.A.A.A.....TATAT..C...CAC... : 110
TS-trnQ-co : G...T.CC..T...A.....A.A.A.A.....TATAT..C...CAC... : 110

```

```

      *      -120      *      -100      *      -80      *      -60
KUL-trnQ-c : ..... : 240
kurume-trn : .....A..... : 240
LEE-trnQ-c : ..... : 240
76/14/S3-t : .....T..... : 240
6088-trnQ- : .....A..... : 240
nf66-trnQ- : ..... : 226
Aq/9/1/45D : .ATCAAT..G...A.....TTA.....AA..GAAC..A...C----- : 157
TS-trnQ-co : .ATCAAT..G...A.....TTA.....AA..GAAC..A...C----- : 157

```

```

      *      -40      *      -20      *      0      *      20
KUL-trnQ-c : ..... : 320
kurume-trn : ..... : 320
LEE-trnQ-c : ..... : 320
76/14/S3-t : ..... : 320
6088-trnQ- : .....G..... : 320
nf66-trnQ- : .....G..... : 306
Aq/9/1/45D : CG..C.TC.C..GCGTAG...T..AT.T.---.G...TT..ACA.....T.....T..... : 229
TS-trnQ-co : CG..C.TC.C..GCGTAG...T..AT.T.---.G...TT..ACA.....T.....T..... : 229

```

図1. 標的遺伝子の配列に見られる置換部位

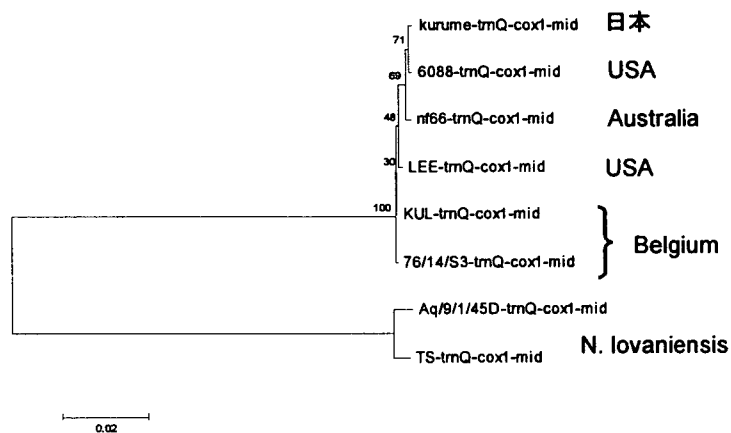


図2. ミトコンドリア DNA の遺伝子配列に基づく系統樹

2)パラフィン包埋切片からのDNA抽出とPCRによる赤痢アメーバの同定

赤痢アメーバ脳炎の試料が入手困難なことから、腸管アメーバ症の病理組織標本を用い、PCRによる特異遺伝子配列の検出を行った。パラフィン包埋切片よりPCRを行い、2つの遺伝子で増幅可能であった。

本研究では病理組織標本から赤痢アメーバのDNA検出を検討した。ホルマリン固定された患者のヘマトキシリン・エオジン染色標本(図3)において組織内に多数のアメーバ様の虫体を確認し、同組織の無染色パラフィン切片(～10 μ m厚)から市販のDNA抽出キット、DEXPAT(タカラバイオ)を用いてDNAを抽出した。PCRによる赤痢アメーバDNAの検出には、2つの遺伝子、peroxiredoxin 遺伝子と ribosomal RNA small subunit 遺伝子を標的にした。その結果、パラフィン切片より100 bpの peroxiredoxin 遺伝子断片が増幅された(図4a)。一方、ribosomal RNA small subunit 遺伝子の増幅では、組織標本がホルマリン固定されていたにもかかわらず、427 bpと比較的長い遺伝子断片の増幅にも成功した(図4b)。

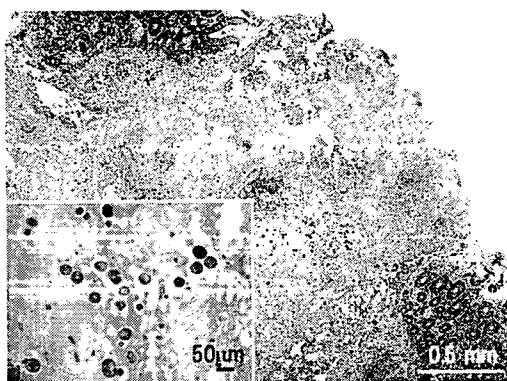


図3. ヒト大腸病理組織像に認められた赤痢アメーバ
病理切片中に多数のアメーバ様虫体が観察される。(HE染色像)

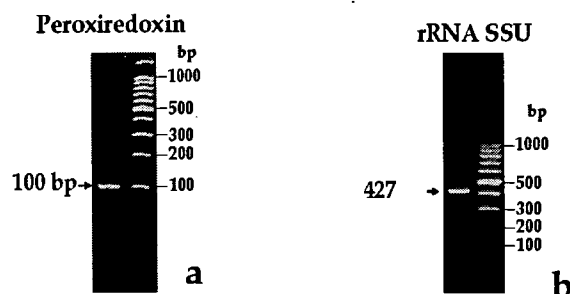


図4a, b. PCR増幅によって得られた特異DNAの電気泳動像

図3. で示した病理組織部位の無染色切片を作成し、DNA抽出を行い、2種類の特異遺伝子部位をPCR反応により増殖した。

D/E. 考察・結論

Naegleria fowleri は26 $^{\circ}$ C以上の水温を好む自由生活性のアメーバであるが、鼻腔を介してヒトに感染するときわめて重篤な急性髄膜脳炎(Primary Amoebic Meningoencephalitis : PAM)を引き起こす。これまでの事例では、大半の患者が1週間程度で死亡するに至っていることから、米国等では生物兵器として使用される可能性が指摘されている。ところで、本アメーバはわが国でも生息が確認されているが、自然界からのアメーバの分離、培地への順化など株の確立には相当の専門知識が必要で、生物テロに使用されるとすれば実験室等からの漏出が問題となる。そこで、当該研究では国内外の研究機関に保存されて、実験に供されている *N. fowleri* 主要株およびわが国での分離株の遺伝子鑑別を行ない、鑑別点を整理した。これにより国内外の実験室で保存・使用されている *N. fowleri* 主要株の traceability が高まった。

一方、アメーバに起因する脳炎は *Naegleria* 以外に *Acanthamoeba* や *Balamuthia* に起因するもの、あるいは *Entamoeba histolytica* による脳内寄生も知られている。当該研究事業では、一昨年よりアメーバ性脳炎の病理組織学的鑑別に向けて *in situ* hybridization 染色法を検討してきた。本年度は、PCR法を用いて組織切片中の *E. histolytica* の特異遺伝子の増幅方法を提案した。本研究では試料入手の都合によりアメーバ性大腸炎患者の検体を用いて検討したが、脳髄膜炎を発症した患者に対して適用出来るものと判断された。

(参考文献)

- 1) Beck V. Advances in life sciences and bioterrorism. Risks, perspectives and responsibilities. EMBO Rep. 2003 Jun;4 Spec No:S53-6.
- 2) CDC Bioterrorism Agents/Diseases Category B: Water safety threats (e.g., *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*) <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>

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

6. ペスト菌の検出と診断法の確立：ペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法の開発

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

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をペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法 (Direct Fluorescent Antibody)を用いて迅速に検出する方法を確立した。ペスト菌をホルマリンで処理したサンプルに対してはペスト菌の類縁菌である *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* へのクロス反応は認められずいずれのペスト菌株に対しても良好な蛍光像が得られる陽性を示したが、ペスト菌を一般的な臨床検査で用いられるメタノール(熱)固定処理した場合には DFA による染色像は殆ど認められなかった。以上の結果からペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体によりホルマリン処理した検体における DFA によるペスト菌の検出法を確立した。

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 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 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。現実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。従来は DNA レベルでのペスト菌の検出方法を開発してきたが、バイオテロの危険に面した場合にはあらゆる手法での検出が要求されてくると想定される。そこで本研究では、バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌をタンパクレベルで検出する方法の確立を試みた。数あるタンパク抗原のうち本研究ではペスト菌の F1 antigen に着目した。F1 antigen は線毛様の構造をしてペスト菌の細胞表面に突出しているタンパクであり(図 1)、ペストに対する protective antigen、そしてペストの血清診断の際に使用される抗原としてよく知られている。本研究ではペスト菌の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法 (Direct Fluorescent Antibody) (以下

DFA) によって迅速に検出できる系の構築を検討した。

B. 研究方法

1) ペスト菌のサンプルの調製

-70℃にてビーズ保存されているペスト菌を Brain-Heart Infusion 寒天培地にて 37℃、もしくは 27℃で 3 日間培養する。菌体は 0.3%のホルマリンで 37℃で 5 日間振盪攪拌する事により不活化し、その一部を Brain-Heart Infusion 寒天培地に塗布して 37℃で 3 日間培養し、菌の生存がない事を確認した。

一方、メタノール固定の場合にはガラススライド上に 2 滴程の蒸留水を滴下し、1 ml loop のディスポーザブル白金耳で一白金耳分の菌体をプレートから接種して、ガラススライドでスメアする。ガラススライドを風乾後、メタノールを滴下し、1 分後に再度風乾し、100℃で 5 分処理した。そのガラススライドを一時間 UV 照射によりペスト菌の完全不活化を行なった。

2) ペスト菌 F1 antigen モノクローナル抗体 FITC conjugate の作製

本研究ではペスト菌 F1 antigen モノクローナル抗体は Virostat 社の *Yersinia pestis* monoclonal antibody (以下 mAb) を購入して

用いた。mAb と 蛍光物質 FITC との結合は Sigma 社の FITC FluoroTag™ FITC Conjugation Kit を用いて添付のプロトコール通りに実施した。FITC ラベルされた mAb (以下 mAb-FITC) は 0.1% NaN₃, 10 mg/ml BSA を含む 0.02M PBS (pH7.2) にて 100 mg/ml の濃度に調製してワーキング溶液を 4℃、ストック溶液を -70℃ 保存した。

3) 直接抗体法 (Direct Fluorescent Antibody)

1) で調製したガラススライド上に 20 µl の mAb-FITC を滴下し、室温で 30 分静置する。その後、PBS で 2 回洗浄後、蒸留水で洗浄後、SlowFade Gold antifade reagent (invitrogen) を 2 滴滴下してカバーガラス及びマニキュアで封入した。そのサンプルを OLYMPUS BX51 を用いて観察し、HAMAMATSU ORCA-ER-1394 を介して画像を得た。

4) 画像の処理

3) で得られた位相差顕微鏡像や蛍光顕微鏡像は AQUA-Lite (HAMAMATSU) を用いて解析した。各画像は bmp 形式で出力し、その画像データを Adobe Photoshop CS2 にて整理した。

C. 研究結果

本研究では、ペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いた直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法の開発を試みた。

mAb は多くある市販品の中で免疫染色にも適しているとされたものを選択した。Western blotting によるこの mAb のペスト菌の抽出液に対する反応性を確認すると MII40 株を除いたすべての株と反応し、その反応性は温度依存的である (図 2) ことから使用には十分足るものと判断された。

DFA を実施するためにこの mAb の FITC との conjugate を作製した。

バイオテロに際して血液、喀痰、患部の切片といった臨床検体が想定される。それらは一般的な細菌検査ではスライドグラスにスメアを取り、メタノール固定、もしくは火炎固定にてサンプルが迅速に処理され、検査過程に移されることになる。その作業工程を踏まえ、メタノール

固定処理したペスト菌 Yreka 株 (ワクチン株) に対して DFA による検出を試みた。様々な条件下で検出を検討したが、いずれの条件下でもメタノール処理した検体に対しては良好な陽性の蛍光像が認められなかった (図 3 左)。そこで、Yreka 株をホルマリンで不活化したサンプルに対して同様の条件下で検出を試みたところ良好な陽性の蛍光像が認められた (図 3 右)。その条件下ではペスト菌の類縁菌である仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、エルシニア腸炎菌 (*Y. enterocolitica*) では蛍光像が認められなかった (図 4) ことからホルマリン処理したサンプルに対する DFA の陽性反応はペスト菌に特異的であることが確認された。

この結果から本研究で選択したペスト菌 F1 antigen の mAb による DFA ではサンプルの処理方法により検出の化不可が決定される可能性が示唆された。それを検証するために国立感染症研究所細菌第一部で管理されている他の複数のペスト菌株に関してもメタノール処理とホルマリン処理によるサンプルを作製し、DFA による検出を試みた。その結果、すべてのペスト菌株においてメタノール処理したペスト菌株に対しては陽性反応が認められなかったがホルマリン処理したペスト菌株に対しては陽性反応が認められた (図 3、5~10)。この結果から本研究で用いた mAb はペスト菌をホルマリン処理により変性状態にしないと反応性が悪いということが明らかとなった。

以上の結果からこの DFA によりホルマリン処理した検体におけるペスト菌をタンパクレベルで 1 時間以内に検出することが可能となった。

D. 考察

バイオテロリズムでペスト菌が病原体として現実に使用される可能性は十分に考えられる。本研究ではペスト菌を DNA レベルで検出する従来の方法とは別に DFA によるタンパクレベルでの迅速検出法の確立を試みた。その結果、ホルマリン処理した検体であればペスト菌の検出は一時間以内で可能となった。一方で、検体を従来の細菌学的手法に基づいてメタノール固定もしくは火炎固定で処理したサン

ルに対しては本研究で用いた mAb は反応しなかったことから この mAb のエピトープはペスト菌をホルマリンで変性しないと細菌表面に出現しない部位に存在すると推定される。F1 antigen 自体は protective antigen であり、ペスト感染に対する診断抗原であるため、F1 antigen を迅速診断のターゲットとして選択することは実用的であると考えられる。おそらく F1 antigen の立体構造が他のタンパクと比較して複雑であるために通常の立体構造上で mAb で反応しない部分がある可能性が考えられる。本研究ではその通常の立体構造をホルマリンで変性させることにより mAb を用いた DFA によって検出する系を確立したが、一方でサンプルの処理に依存しない DFA による検出系の開発も必要であると考えられる。他の mAb や 他の ペスト菌抗原、もしくはポリクローナル抗原などを用いた DFA によるペスト菌の迅速検出系のさらなる開発も必要であろう。

E. 結 論

ペスト菌 F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法によるペスト菌の迅速検出法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高橋英之、渡辺治雄、新感染症学（下）、-新時代の基礎・臨床研究-、ペスト、日本臨牀 65 増刊号 3、54-59、2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

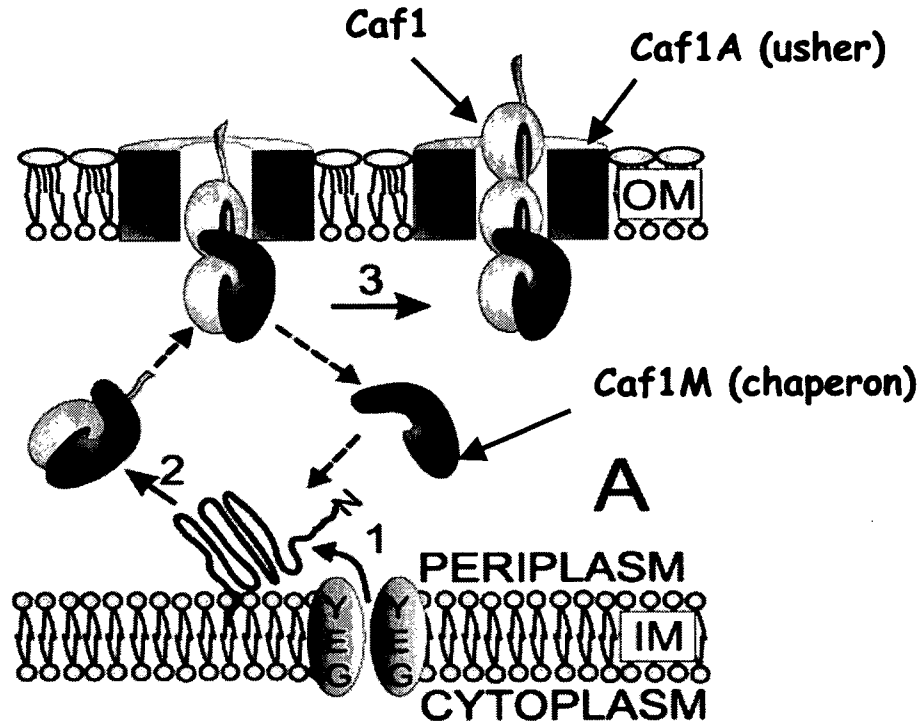
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 ペスト菌 F1 antigen の模式図



Molecular Microbiology (2002) 45(4), 983-995より抜粋

図2 Western blotting によるペスト菌 F1 antigen mAb の特異性の検証

