

いて検査を行った。このケースは、a) 患者と共に渡航した他の二名も同様に発症したこと b) 渡航地のマレーシアが類鼻疽の流行地域であること、c) 肺病変が認められたこと、の三点から類鼻疽が疑われた例である。送付された検体をチョコレート寒天培地に塗抹して 35℃で一週間培養した。また、肺組織から QIAamp mini で抽出したゲノム DNA を鋳型として LAMP 法で検査した結果、いずれの方法も類鼻疽菌陰性であった。

この検体はその後、国立感染症研究所・病理部と生物活性物質部により解析され、ヒストプラズマ感染症であったことが明らかになった。

3) 環境検体からの菌分離の基礎検討

土壌を検体として *Burkholderia* 属の選択培地を使用して分離培養を試みたところ、Ashdown 選択液体培地、TB-T 選択液体培地で増菌した菌を植え継いだ Ashdown 寒天培地より *B. cepacia* の可能性のある菌が分離された。コントロールとして、増菌した Ashdown 選択液体培地と TB-T 選択液体培地をそれぞれ 100 μ l チョコレート寒天培地に接種したところ、カビと細菌が一面に増殖しコロニーを得ることはできなかった。今回用いた液体培地と寒天培地の組み合わせが *B. pseudomallei* の検出に適しているかはまだ明らかではないが、選択培地を用いると、ある程度、菌種と菌数が制限されることが示された。

D. 考 察

作成中の類鼻疽の診断・同定マニュアルについて、コンケン大学との情報交換により改正すべき点が明らかになった。今後、流行地域で行われている類鼻疽菌の分離同定法が日本で実用的かどうか、細菌第二部で保有している類鼻疽菌株を用いて検証を行う。結果をふまえて、日本国内で検出を行う上で適切なマニュアルに改正していく。例として、コンケン大学病院では臨床検体の培養に MacConkey 培地を使用しているが、日本国内では類鼻疽疑い例の臨床検体

が送付された場合、その検体が実際に類鼻疽である例は非常に稀であるため、原因菌の確実な分離のために MacConkey 培地と併行してチョコレート寒天培地を使用する必要があると考えている。また、診断の際に参考にする情報として東南アジアや北部オーストラリアなどの流行地域への海外渡航歴があるかを考慮すべきである。新たに臨床検体の依頼検査が来た場合には作成したマニュアルに従って対応する。

また、現在用いている LAMP 法は血液検体では感度がよくないという報告のため改良する必要がある。さらに、LAMP 法のプライマーを地方衛生研究所に配布する必要性が生じた場合には陽性コントロールを同時に配布する必要があるため、陽性コントロールプラスミドを作成したい。また *B. mallei* については次年度以降基礎検討を開始する。

E. 結 論

本年度は類鼻疽菌の分離同定マニュアル作成を念頭において検討を行った。新たに類鼻疽流行地にあるタイ・コンケン大学との共同研究が開始され、現在作成中のマニュアルについて、類鼻疽菌の分離時に使用する培地や行うべき試験など改善すべき点が明らかになった。今後これらの点について、保有する類鼻疽菌株で検証した後に国内使用に適切なマニュアルを作成する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

6. 炭疽、ブルセラ、野兎病菌等の網羅的細菌迅速診断法の確立

研究分担者 牧野 壮一 国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者 江崎孝行 (国立大学法人岐阜大学・医学部)
倉園久生 (国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部)
川本恵子 (帯畜大・大動物特殊疾病研究センター)

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃が現実のものとなった。バイオテロに使用される病原体による感染症は希少かつ急性で、発生した場合には通常の医療機関並びに検査機関での検出・診断が困難である。同時に、そのような病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究ではバイオテロ候補の危険度レベル3に属し、検出・予防・治療法が不十分である炭疽菌、野兎病菌、ブルセラ菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて、網羅的に検出できるシステムの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。PCR法による遺伝子検出法はほぼ確立しているので、病原体を迅速に検出できる網羅的な検出法はPCR法を基本として開発する。また、病原体の免疫学的手法を用いた検出・検査法の開発も同時に遂行する。

A. 研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では「白い粉」による多数の模倣事件が起こり、その後、内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などである。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。バイオテロは

病原体等が散布されて患者発生までに潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分

である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病原体分離同定法、特に二種病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来からのワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残し、炭疽常在地となる。ヒトの疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと99%死亡する。実際、

感染後24時間以内に大量の抗生物質を投与すれば死亡率は極端に低下するが、発症してしまうと急激に重篤な状態に陥ってしまう。すなわち、血流中に炭疽菌が入り込んでしまうと抗生物質もほとんど効力がなくなる。

一方ブルセラ症は、いろいろな脊椎動物に感染し病気を起こすブルセラ菌によって起こる感染症で、種によって、主に感染する動物が異なる。*Brucella abortus*がウシ、*B. melitensis*がヒツジ・ヤギ、*B. suis*がブタ、*B. canis*がイヌに主として感染し、ヒトはこれらの感染した動物との接触によって、あるいは、ブルセラ菌によって汚染された動物由来の製品との接触によって感染する。即ち、動物のブルセラ症が多く見られる場所ではヒトのブルセラ症もよく発生する。従って、動物へのワクチン接種などによるブルセラ症の撲滅が本感染症の人への自然界での蔓延を防ぐ最適な方法であるといえる。ヒトのブルセラ症は全身症状を呈し、あらゆる臓器に感染を起こすことで知られており、その症状に特異的なものではなく、発熱、発汗、疲労、体重減少、うつ状態などの症状がみられる、いわゆるやる気をなくすようなけだるさが長期間継続し慢性化する特徴がある。さらに、ブルセラ菌は実験室内感染の危険性が高く、噴霧状態での感染が容易に起こる。そのため、生物兵器として使われることが心配されている。ブルセラ症の診断には一般的に抗体価の上昇で調べるが、ヒトにおけるブルセラ症の診断法は確立されておらず、家畜の国際標準法に従って実際は行われている。しかしこの国際標準法では、*Yersinia enterocolitica* O9 との交差反応が強いこと、ワクチン接種群における抗体価が高いことなどがあり、確実なブルセラ症の診断はできない。例えば、平成13年のヘラジカのブルセラ騒動はオーム病との交差反応であった。ブルセラ特異的な診断法は確立されていない現状にある。

鼻疽は本来動物特にウマの疾病で細菌性病原体としては危険度が最も高い危険度3に区分される。土壌中に存在する病原体が皮膚の傷口に付着し創傷感染、リンパ節へと広がっていく。また粉塵から飛散した菌を吸引し肺炎、あるいは眼球結膜に付着し涙囊の感

染と鼻出血をおこす。涙腺炎と鼻出血はこの病気の特徴的な所見である。ウマの密度の高い中国の内モンゴルでは現在も感染するケースがあるとされているが、人の感染例も姿を消しつつある。しかし、類鼻疽はヒトの疾患で、亜熱帯から熱帯地方の土壤に分布し東南アジアでは患者数は高く、致死率も高い危険な疾患である。特にタイ、マレーシア、ベトナム、北部オーストラリアの患者発生率が高い。両病原体は土壤に分布するため農作業中に感染するケースが多い。皮膚の傷口から感染し潰瘍、リン節の腫瘍が前駆にでる場合と土壤中の菌を吸引して肺炎が全面にでる場合がある。糖尿病や肝臓疾患等で免疫低下がある人が感染するとしばしば経過が長期化し致死的な全身感染症になる。タイでは毎年約100例以上の死亡が報告されている。

野兎病は、野生の動物の病気で、ヒトも感染する。北アメリカ・北ヨーロッパ・北アジアに広く見られ、野兎病菌を持った虫にかまれたり、刺されたりして、あるいは、野兎病菌に汚染したものや動物に接触してヒトは感染する。発生は通常散発的だが、ときに流行を示す。2000年には北欧で蚊の媒介による流行があった。また、野兎病菌は、10-50個の菌だけでも、皮膚に付着したり吸引で感染・発病する可能性があり、症状もベストに似て重症化しやすいので、生物兵器として使われる可能性が危惧されている。

テロの探知には個々の病原体ごとに検査するのではなく、対象病原体について網羅的に迅速に検出することが必要である。そこで、本研究では、そこで、バイオテロの迅速スクリーニング法と核酸クロマトおよびイムノクロマト法の開発に焦点をあて、遺伝子検出法及び免疫学的検出法を応用し、炭疽菌を中心とした網羅的な検出・診断法の開発、及び病原性因子の解析による新たな治療方法の開発を試みる。

B. 研究方法

1) 野兎病に関する研究

平成 18 年度から、野兎病が疑われる患者に対する免疫学的診断法と野兎病菌に対する免疫学的迅速同定法の確立を試みている。本年度は、平成 19 年度に確立した野兎病菌に対

する特異抗原 (FopA-GST 融合タンパク質) の精製法を改良して野兎病菌表在抗原 (FopA) の大量精製に成功し、家兎抗血清の作製に着手した。

1. FopA-GST 融合蛋白の精製: Re-fold した FopA-GST 融合蛋白は、まず Glutathione Sepharose 4B クロマトで精製した (詳細は平成 18 年度報告書に記載)。
2. Glutathione Sepharose 4B クロマトの FopA-GST 分画の濃縮: アミコン濃縮、硫酸塩析、Ficoll PM400 による濃縮を試みた。
3. 濃縮した Glutathione Sepharose 4B クロマトの FopA-GST 分画のゲル濾過: GE Healthcare 社の Superdex 75 カラムで 50mM PB + 0.2 M NaCl を用いて溶出した。
4. 精製 FopA-GST 融合蛋白標品のチェック: ゲル濾過のピークパターンと最終精製標品に対しては、SDS-PAGE を行った。

2) バイオテロ感染症の網羅的検査

細菌のバイオテロ感染症では暴露後、数日から数週間発症するため、暴露者は一般病院、あるいは救急病院の外來を呼吸感染、もしくは不明熱で受診すると想定される。従って診断システムは市中肺炎検査にマウントした遺伝子検査法を作出すれば、早期発見につながる。逆にバイオテロ対象のプライマーセットを作っても診療で使用してもらえない可能性が高いので、網羅的遺伝子検査は日常スクリーニング用とハイリスク時の救急検査の 2 つにわけた対応が必要であると考えられる。

そこで、網羅的な方法として、カクテル PCR を開発した。本方法は、異なるプライマーを混合して用いる従来の Multiplex PCR と異なり、各種病原体用の特異的プライマー配列の末端に同一の配列 (Tag 配列) を連結した Tag 付きプライマーを用いることにより、同一のプライマー配列を利用して遺伝子増幅が起こるので、(1) 増幅産物は通常 1-2 種類なので増幅産物の増幅競合はおこらない、(2) すべてのカクテルを同じ条件で増幅できる、(3) 単独プライマーと同等の感度を得られる、(4) Primer 領域に SNP がたくさんあるウイルスには最適、(5) 最高 50 種類まで感度を落とさずに混合が可能、などの利点を有し、一回の PCR 反応で陽性かどうか判定でき、経済的に有利である。

3) 炭疽菌に関する研究

炭疽菌の防御抗原 (PA) を構成する4つのドメインのうち抗原性の高い領域の組換えタンパクを作製し、蛍光偏光法 (Fluorescence Polarization Assay; FPA法) を用いた迅速な炭疽感染検出法を樹立した。また、炭疽菌に対する感受性を疾患モデルマウスで検討し、疾患と炭疽の感染リスクについて分析した。

FPA法は、偏光励起光を蛍光物質に照射することにより、蛍光物質から発せられる蛍光が分子量に応じて異なった偏光度を示すという特性に基づいた測定方法で、蛍光標識サンプルに偏光を照射し蛍光分子が回転する度合いを表す偏光度を計測する。蛍光分子により標識された小さな分子は、回転速度が速いため蛍光の偏光が解消され、偏光度は小さい値を示す。一方、大きな分子の場合は回転速度が遅いため蛍光の偏光は解消せず偏光度は大きな値を示す。このように偏光度の違いを分子サイズの違いとして捕らえ相互作用の有無を検出する方法で、化合物のような小さい分子のスクリーニングに適している。

(倫理面への配慮)

病原体の使用は、病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C. 研究結果

1) 野兎病菌に関する研究

1. FopA-GST 融合蛋白の精製: 平成 18 並びに 19 年度に行った方法 (IB になった本融合蛋白を Urea で Re-fold して Glutathione Sepharose 4B クロマトにかける) により、1.0 リッター分の菌体から 3.75 mg の粗 FopA-GST 融合蛋白を得た (表 1)。
2. Glutathione Sepharose 4B クロマトの FopA-GST 分画の濃縮: 次のステップのゲル濾過のために FopA-GST 分画の濃縮を試みた。アミコン濃縮ではメンブランに大部分の蛋白が非特異的に吸着して使用できない事が判明した。次いで硫酸塩析を試みたがこれも大部分の蛋白が不溶化してし

まい使用できない事が判明した。Ficoll PM400 による濃縮でも蛋白のロスが観察されたが、許容範囲であった (表 1)。

3. 濃縮した Glutathione Sepharose 4B クロマトの FopA-GST 分画のゲル濾過: 濃縮した粗精製 FopA-GST を Superdex 75 でゲル濾過したところ、Retention time 約 12 分にシングルピークとして溶出された (図 1)。

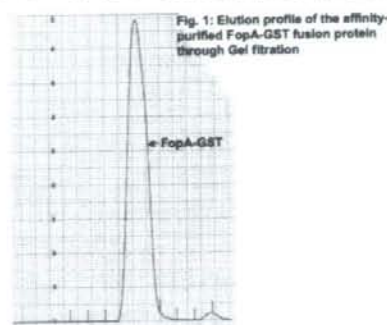
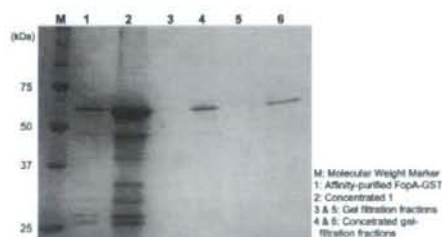


Table 1: Recovery of the FopA-GST fusion protein from 1.0 liter culture through the purification procedures

Purification procedures	Total protein	Recovery ratio
Glutathione Sepharose 4B chromatography	3.75 mg	100%
Concentration by Ficoll PM400	2.68 mg	71.5%
Superdex 75 gel filtration	2.46 mg	65.6%
Concentration by Ficoll PM400	0.95 mg	25.3%

Fig. 2: SDS-PAGE profiles of the FopA-GST fusion protein through the purification steps



4. 精製 FopA-GST 融合蛋白標品のチェック: Glutathione Sepharose 4B クロマトの溶出分画 (図 2-1) を濃縮すると、まだ多くの蛋白が混在していた (図 2-2)。このサンプルを Superdex でゲル濾過して (図 2-3 & 5)、濃縮すると (図 2-4 & 6)、1 本のバンドとして泳動された。

2) バイオテロ感染症の網羅的検査

カクテルPCRの特徴を図3に示す。この方法を用いて、まず肺炎をスクリーニングするプライマーセットを13種類の病原体に対して作製した。具体的には、バイオテロ利用の5種類、市中肺炎用の8種類のセットを作製した。PCRはReal Time PCRを使用した。反応時間は20分程度で判定でき、迅速性に優れている。PCRの結果が陰性の場合には対応している感染症ではなく、特にテロには関係ないことが迅速に判定できる。陽性の場合には、確認用のPCRもしくは別の確認用の方法で対象病原体が特定できるはずである(図4)。

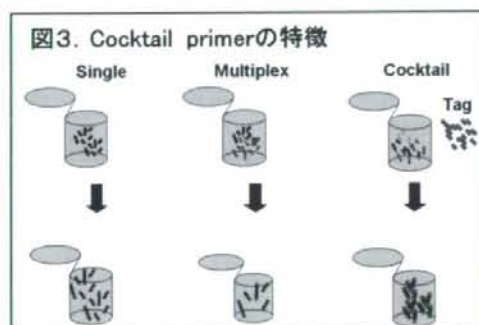


図4. 肺炎スクリーニング用 Cocktail PCR(13種類)

バイオテロ用

病原体	増幅遺伝子	増幅産物(bp)
<i>Bacillus anthracis</i>	pagA	154
<i>Brucella melitensis</i> all pathovars	BCSP31	243
<i>Burkholderia pseudomallei</i> mallei	dnaJ	162
<i>Francisella tularensis</i>	dnaJ	135
<i>Yersinia pestis</i> - pseudotuberculosis	dnaJ	205

市中肺炎用

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	DnaJ	225
<i>Legionella pneumophila</i>	DnaJ	185
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LyfA	152
<i>Haemophilus influenzae</i>	DnaJ	179
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	DnaJ	219
<i>Coxiella burnetii</i>	DnaJ	212
<i>Rickettsia</i> spp	DnaJ	263
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	DnaJ	194

図5. テロ確認用病原因子primer(14種類)

病原体	遺伝子	増幅(bp)	Tm
<i>Bacillus anthracis</i> Sap gene 5' lever	Sap	131	81.8
<i>Bacillus anthracis</i> Lethal factor (lef)	LF1	158	80.2
<i>Bacillus anthracis</i> Protective antigen pagA2	pagA2	154	80.7
<i>Bacillus cereus</i> anthracis group dnaJ	DnaJ	207	80.2
<i>Brucella melitensis</i> all pathovars	DnaJ	165	89.6
<i>Brucella melitensis</i> all pathovars	BCSP31	243	87.5
<i>Burkholderia pseudomallei</i> mallei	dnaJ	162	84.7
<i>Burkholderia mallei</i> - pseudomallei group OMP	OMP	171	89.4
<i>Francisella tularensis</i> dnaJ	DnaJ	135	80.6
<i>Francisella tularensis</i> Outer Membrane Protein	fopA	232	82.2
<i>Yersinia pestis</i> Yopx plasmid	YopM	162	x
<i>Yersinia pestis</i> Pla plasmid	Pla	177	x
<i>Yersinia pestis</i> - pseudotuberculosis regulatory plasmid	Lcr	171	x
<i>Yersinia pestis</i> - pseudotuberculosis dnaJ	DnaJ	205	87.4

陽性の場合迅速に病原体を特定する方法として、テロ用の確認用のPCRを図5にします。このPCRもReal Time PCRを利用することによりトータル1時間内には判定可能となる。

さらに、肺炎の確認用プライマーにボツリヌス菌のスクリーニング Tag primerを追加し、16種類の Tag primerセットを作成して土壌、水、食品検査用とし、バイオテロ病原体の網羅的検索方法(土壌、水、食品)を作成し

図6. 追加したプライマー

<i>Clostridium botulinum</i> A Toxin	183
<i>Clostridium botulinum</i> A DnaJ	212

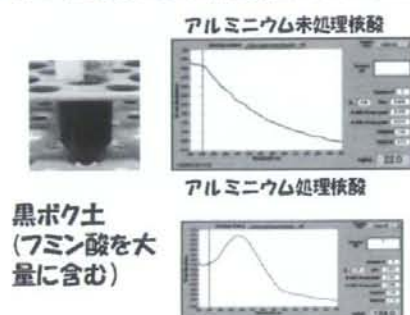
た(図6)。

この際に、土壌からPCRの阻害物質であるフミン酸をアルミニウムで効率良く除去する抽出方法を作成した(図7)。詳細は現在商品化の途中であり、次年度に報告する。

また、バイオテロ感染症の網羅的抗原および抗体検査法は、病原体の最終確定もしくは患者の診断に有用であり、バイオテロ対策に必須のシステムである。そこで、遺伝子検査法とともに、研究開発を目指す。まず、類鼻疽菌、野兔病菌、レジオネラ菌はいづれも免疫中で、今後ペスト菌、炭疽菌芽胞、ブルセラ菌を計画している。また、Luminex Beadsに病原体抽出抗原を固定し血清抗体価を測定する系を確立するために、類鼻疽菌はLPS抗原を、ブルセラ菌は加熱抽出抗原を用いて一部

検証を行い昨年度既に報告している。さらに、野兎病菌、ペスト菌、炭疽菌を計画中である。

図7. 土壌からの核酸抽出法の開発



3) 炭疽菌に関する研究

蛍光偏光法は、血清などの液体中のサンプルから抗体など検出対象物を分離することなく、蛍光プローブを添加後、数秒で測定できるため、迅速で簡便な検出法として知られる。しかし、測定対象物の検出系を樹立するためには、「蛍光プローブの分子量」を最適化する必要がある。炭疽菌防御抗原 (PA) の大きさは約85 kDaであるが、これではプローブ用には大きすぎる。PAは4つのドメインから構成され、最も抗原性の高い領域はdomain 3である。しかし、この領域だけでは蛍光偏光法用のプローブとしては分子量が不十分であるため、domain3と4を連結した組換えタンパクを作製し (PA3/4)、プローブとして用いることとした。炭疽菌DNAを鋳型として、5'-att CATATG act gca cgt atc att ttt aat-3', 5'-aga GGATCC tcc tat ctc ata gcc ttt -3'のプライマーによりPA 3/4領域を増幅し、pET15bにライゲーションして、発現ベクターを構築した。BL21大腸菌に導入し、IPTGにより発現誘導し、菌体から組換えタンパクを精製した。分子量は塩基配列から28.5kDaと予想されるが、その位置に精製タンパクのバンドが確認できた (図8)。得られたタンパクが抗原性を有するかどうかをELISAにより検討した。PAあるいはPA 3/4を96-well plateにコートし、抗PA抗体との反応性を調べた。その結果、PA 3/4はPAに比べ低い吸光度を示したが、陰性対象として用いた抗LF抗体には反応せず、抗PA抗体にのみ特異的に反応することを免疫学的に確認した (図9)。続い

Protein purification

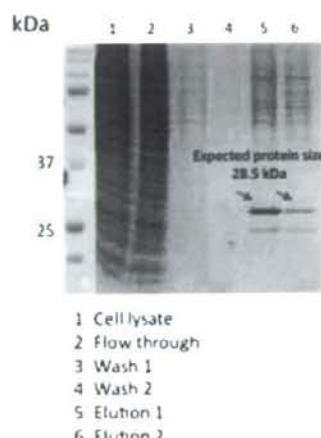


図8 フローブ用組換えPAドメインの作製

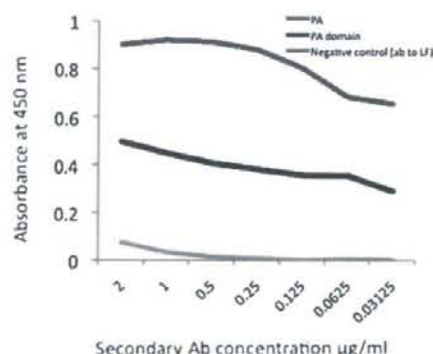


図9 組換えPAドメインの抗原性

て、PA 3/4をFITCで標識し、蛍光プローブを作製した。このプローブを用いて、抗体価を指標とした炭疽菌感染検出用蛍光偏光法の最適化を行った。図10に示すように、FITC標識PA 3/4を用いた蛍光偏光度測定により、抗体抗原反応をリアルタイムにモニタリングしたところ、炭疽感染血清では非感染血清に比べ高い偏光度を示した。測定は96-well plateで行い、蛍光プローブ添加後、5分で終了可能であった。今後、さらに高感度に測定するためには、FITCとPAドメインのラベリング効率を上げる必要があると思われる。以上の結果から、PA domainを利用した蛍光偏光法は炭疽感染の有無に有用であることが示された。

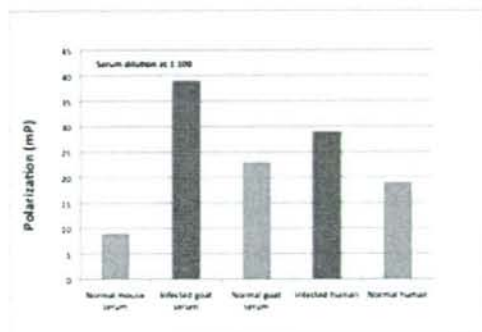


図10 FITC標識PA3/4を用いた各種動物血清のFPAアッセイ

また、前年度樹立したELISA法の有用性を検討するため、炭疽のendemic地帯であるモンゴルにて、ウシ、ラクダ、ヒツジ、ヤギなどの草食獣の血清サンプルを集め、抗体価を調べた。その結果、ワクチン接種群においても抗体価は様々で、十分に抗体価が上昇していない個体も多くみられた(図11)。また、ワクチン未接種群でも高い抗体価を示す個体が検出され、自然感染が多いことが示された。以上の結果から、モンゴルで炭疽が多発する背景に、草食獣のワクチン効果が十分でないことが考えられた。

さらに、炭疽菌に対する感受性を疾患モデ

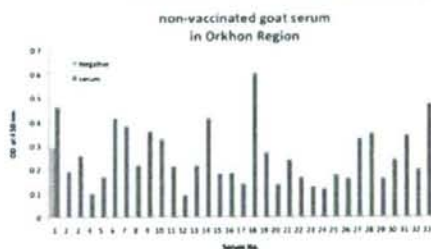


図11 Orkhonのワクチン未接種動物のPA抗体価

ルマウスで検討し、疾患と炭疽の感染リスクについて分析した。近年、日本ではアレルギーや糖尿病などの罹患率が多く、これらの病態には免疫異常が背景にあることが知られている。宿主の感染防御機構の異常は病原体に対する感染リスクに影響を与える重要な要因となりうる。そこで、糖尿病患者における炭疽発症リスクを検討するため、糖尿病モデルマウスを用いて炭疽菌感染実験を行った。マウスは日本で多い2型糖尿病モデルマウスを用いて検討した。その結果、糖尿病モデルマ

ウスは、炭疽菌に対する感受性が高く、重篤化しやすいことが明らかとなった(図12)。炭疽発症の初期過程では、マクロファージ内

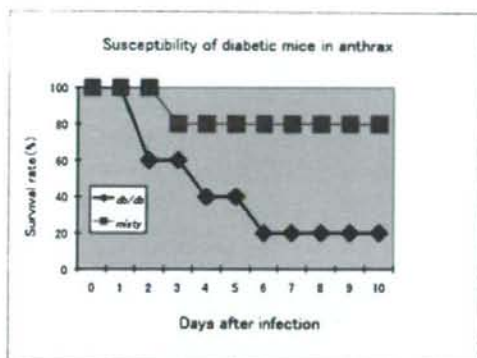


図12 糖尿病モデルマウスの炭疽菌に対する高感受性

10⁶個の炭疽菌芽胞を腹腔投与し、生存率をモニタリングした。糖尿病マウスでは対照マウスに比べ、著しく感受性が高かった。

での発芽が重要である。しかし、マクロファージに侵入後、芽胞がどのように宿主の殺菌機構を回避して細胞内で発芽・増殖するのか、そのメカニズムについては明らかにされていない。通常、貪食細胞に補食された病原細菌は、食胞(ファゴソーム)に取り込まれ、や

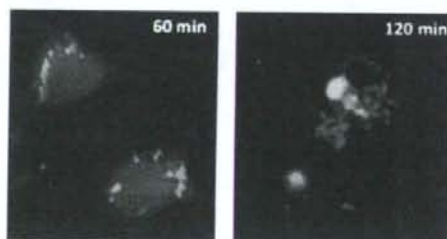


図13 炭疽菌芽胞とLAMP-1(リソソームマーカー)の局在性

がてリソソームとの融合によって消化される。野性型の炭疽菌芽胞(赤の蛍光)を感染させた糖尿病マウス由来のマクロファージでは感染60分後でも炭疽菌芽胞とリソソームマーカーであるLAMP-1(緑の蛍光)と局在性が一致しておらず、120分後には芽胞は発芽し、栄養体が増殖している(図13)。これが糖尿病マウスの炭疽菌に対する高感受性に関与する可能性が考えられた。すなわち、糖尿病をもつ宿主は炭疽の感染リスクが高く、これらの宿主においては炭疽菌感染の初期過程を効率的に抑えることが感染防御に重要であることが判明した。通常のヒト用炭疽ワクチンは、

発芽後の栄養体が産生する毒素成分を利用した成分ワクチンで、発芽過程に対する効果は期待できない。今後、炭疽の初期過程である発芽阻害を標的とした治療・予防法の開発が必要と思われる。

4) 病原体のPCRによる検出系

本研究課題に関連し、前述以外の病原体について、本分担研究班でPCR法を既に確立している系を図14に示す。特定病原体の中で、細菌性病原体はすべてが網羅されている。また、その他、ボツリヌス毒素とペロ毒素に対しても対応可能な状況であり、さらに、一部の真菌やリケッチャなども対応可能な状況にある。これらすべてがReal Time PCRの系で対応可能であり、LAMP法なども一部対応可能となっている。

D. 考 察

1) 野兎病菌に関する研究

本年度は、野兎病菌に対する特異抗原(FopA-GST 融合タンパク質)を大量に精製するために、平成19年度に確立した精製法の改良を試みた。旧法で使用したHydroxyapatite CHIIカートリッジとTSK SWSL G3000カラムはFopA-GSTの非特異的吸着が起り、濃縮に用いた硫酸塩析もFopA-GSTの不溶化を引き起こす事が分かった。そこで、ゲル濾過のレジンとしてポリマーではなくガラクトース系のSuperdex 75を採用したところ、回収率が飛躍的に上昇した(表1)。更に、Ficoll PM400によるサンプルの濃縮を行ったところ、多少のロスはあるもののFopA-GSTを十分に回収できた(表1)。最終的に得られた精製FopA-GSTは、ゲル濾過でシングルピークを示し(図1)、濃縮してもSDS-PAGEで1本のバンドとして泳動された(図2)。

現在、精製したFopA-GSTで家兎を免疫中である。抗血清が得られ次第、FopAに対するELISA系を作成してその野兎病原体に対する特異性を検討する。

更に、平成15年度に作成した*F. tularensis*全菌体に対する家兎抗血清及び患者血清を用いて、精製FopA-GSTの野兎病診断における診断用抗原としての有用性をELISA系で検討する。今後、FopAのdeletion mutantsを作成して構築したELISA系を用いてエピトープ検索を行い、

更に精度の高い野兎病菌迅速同定法を構築する予定である。

2) バイオテロ感染症の網羅的検査

細菌性バイオテロの迅速検査法について検討を行い、一本のチューブ内で一回の反応でバイオテロ発生の可能性を判定可能な系を作出した。網羅的な検出法として使用可能な方法である。また、今回の方法は迅速にスクリーニングが必要な、今回示した肺炎の場合など、有効な治療法を実施するのに有効である。また、特異的なプライマーが作成されれば、全ての感染症に対応可能である。同様に、たのPCRを利用した網羅的な方法へも十分対応可能となる。

3) 炭疽菌に関する研究

1. 炭疽菌の検査法は遺伝学的、免疫学的方法はほぼ完成し、発生国でのサンプルを用いた実証検証の結果、本研究により開発した検査系は有用であると思われる。
2. 新たな迅速検出法として、蛍光偏向法を開発した。
3. 糖尿病患者では炭疽の感染リスクが高く、罹患者数の多さを考えるとこれらの患者に対する対策を検討する必要性が示された。

4) 病原体のPCRによる検出系

網羅的な検出系の作成と社会への還元を行うために、他の分担研究班と協力して、網羅的検出系の構築を行う予定である。

E. 結 論

1. FopA-GST 融合蛋白の大量精製法を確立した。この精製FopA抗原を用いて野兎病迅速診断法および野兎病菌迅速同定法の構築が可能となった。
2. テロ対策用の網羅的な検査法の確立のアウトラインが完成した。今後はこの方法の実用性について検証する必要がある。また、今後はウイルスやリケッチャなども含めた網羅的な検出法の開発に協力する予定である。
3. 炭疽菌の検出法は今年度で完成できたといえる。また、炭疽菌高感受性グルー

プに対する対策が必要と思われる。

4. 網羅的な検出系の確立が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto, H., Kurazono, H., Mukaida, N., Mukhopadhyay, A. K., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, Y., Moss, J., and Hirayama, T.: Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. *J. Immunol.* 180 (7): 5017-5027, 2008.
2. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaroj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaroj, T., Hayashi, H., Nair, G.B., Chongsanguan, M., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Health Popul. Nutr.* 26 (1): 79-87, 2008.
3. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* In press, 2008
4. Takahashi A, Muratani T, Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima, H, Kurazono H, Yamamoto S: Genetic profile of fluoroquinolone -resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAI subtypes, and mutation patterns. *J. Clin. Microbiol.* in press, 2009
5. 大楠清文、江崎孝行 2008. 遺伝子検査による好酸菌感染症の迅速診断、結核: 83:681-698
6. 大楠清文、江崎孝行 2008. 遺伝子検査による呼吸器感染症の迅速診断、呼吸器科、14:63-74
7. 江崎孝行、2008 微生物の危険度分類、臨床と微生物 35:279-292.
8. 大楠清文、江崎孝行 2008. 感染症診断における遺伝子解析技術の適応、日本臨床微生物学雑誌、18:163-176.
9. Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol.* 2008. 159:709-717.
10. Okada Y, Makino S, Okada N, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. *Food Addit Contam.* 2008. 15:1-6.
11. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008. 104:1815-1823.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

図14. 現在PCRにより検出可能な病原体

二種	炭疽菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	野兔病菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	ペスト菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	ボツリヌス菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	ボツリヌス毒素	毒素	作成中	
三種	Q熱コクシエラ	リ	Realtime PCR	無し
	多剤耐性結核菌	細菌	Realtime PCR	無し
	コクシジオイデス真菌	真菌	Realtime PCR	無し
	日本紅斑熱ノケッチャ	リ	Realtime PCR	無し
	発疹チフスリケッチャ	リ	Realtime PCR	無し
	鼻疽菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	ブルセラ属菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	類鼻疽菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	ロッキー山紅斑熱ノケッチャ	リ	Realtime PCR	無し
	クリプトスポリジウム	寄	Realtime PCR	あり
四種	結核菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	コレラ菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	志賀毒素	毒素		あり
	赤痢菌属	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	チフス菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	腸管出血性大腸菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	あり
	パラチフスA菌	細菌	Realtime PCR, LAMP	無し
	オウム病クラミジア	リ	Realtime PCR	無し

検査やコントロールの配布可能

7. 細菌毒素の迅速検出法の開発

研究分担者 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 見理 剛 (国立感染症研究所)

向本雅郁、小崎俊司 (大阪府立大学)

東 成見、黒澤良和 (藤田保健衛生大学)

高山勝好、小林行治 ((株)アドテック)

研究要旨 マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度迅速検出系としてサンドイッチイムノ PCR 法およびイムノクロマトキットの開発を検討した。サンドイッチイムノ PCR の検討はサンドイッチ ELISA の基礎条件の検討を行い、A 型神経毒素約 300 pg/mL を検出できる系を確立した。この反応条件を基に市販キットを使用してサンドイッチイムノ PCR を行った結果、検出感度は 100 pg/mL でサンドイッチ ELISA と比較して高い感度の結果が得られた。イムノクロマトキットについては金コロイドの検出系で約 10ng/mL (1000 マウス ipLD₅₀/mL) の毒素を検出する試作品が完成した。このキットは次年度に国内ボツリヌスレファレンスセンター等に配布して有用性の検証・確認を行う。

A. 研究目的

ボツリヌス菌が産生する毒素は抗原性の違いにより A から G 型の 7 型に分類されており、ヒトのボツリヌス症は A、B、E 型菌が産生する毒素によるものが多い。ボツリヌス毒素は微量でヒトに致死性の中毒を起こし、他の毒物と比較して致死活性が著しく高いため、バイオテロ発生にあつては、試料から検出するためには迅速で高感度の検出系を利用することが必須となっている。現在のところ最も感度および信頼性が高い国際的なボツリヌス毒素の標準検出・定量法はマウス腹腔内接種法である。検査試料をマウス腹腔内に接種し、経時的に観察し、腹部陥没等のボツリヌス毒素特有の症状を示して死亡することを確認する。毒素型別は診断用抗毒素血清を用いたマウス接種中和試験により判定する。本法による毒素の検出感度は、高度精製した毒素蛋白換算で 10~100 pg/ml である。本法は実験動物を用いる試験のために動物管理施設や動物入手までに日数を要すること、また最終的な定量法の判定まで最長 4 日を要するため、迅速法としては不向きである。近年、実験動物愛護の観点から WHO 等の国際機関でも動物を用いた試験は代替法を検討すること、実験に際

して動物数を減らすこと、試験の適性を確認することなどが求められる (3Rs)。

本研究では、ボツリヌス毒素検出系として検出感度、操作性、迅速性からマウス接種法より優れている方法の開発を目指す。現在、各方面で開発が進んでいるサンドイッチイムノ PCR 法を確立することを一つの目的とする。目標検出感度はマウス接種法と同等かそれ以上 (約 10 pg/ml=約 1 マウス腹腔内投与 (ip) LD₅₀/mL) を目指す。今年度は A 型毒素を検出材料とし、検出系作製に必要な抗体を選別し、サンドイッチ ELISA での検出系を構築する。サンドイッチ ELISA で用いた各種反応条件を参考にサンドイッチイムノ PCR で毒素の検出を行う。また、人型ボツリヌス抗体の研究で得られた産物である A 型ボツリヌス毒素を特異的に中和するヒト型抗体を利用してイムノクロマトキットの開発を検討する。本キット開発に当たっては、商品化を狙って他の病原体を製造販売している企業との共同研究を実施する。試作した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検査を実施する機会があり、評価のポイントを理解している地方衛生研究所の担当者

に試験を依頼し、操作法や感度も含めた評価を客観的にこない商品化に結びつける。

B. 研究方法

1. サンドイッチイムノ PCR

1) 抗 A 型神経毒素ポリクローナルおよびモノクローナル抗体

アフィニティ精製ウサギ抗 A 型ポリクローナル抗体は常法により A 型トキソイドおよび神経毒素を複数回ウサギに免疫することにより得られた抗血清を出発材料として、カブリル酸法および神経毒素をカップリングしたアフィニティカラムにより精製し作製した。モノクローナル抗体は常法により作成したハイブリドーマより神経毒素との反応性が高い IgG を産生する 14 クローンを選択し、無血清培地で培養した培養上清よりモノクローナル抗体を精製し使用した。モノクローナル抗体の L 毒素、M 毒素、神経毒素との反応性の検討はサンドイッチ ELISA により行った。

2) サンドイッチ ELISA

サンドイッチ ELISA により毒素検出系を構築するための条件検討は以下のように行った。固相化抗体はモノクローナル抗体 (10 μ g/mL) を各ウエルに 0.1ml 加え、37°C で 2 時間反応させた。ブロッキングはイムノ PCR で用いる試薬と同様のカゼイン溶液 (キットに添付) を各ウエル 200 μ l 加え、4°C で一晩静置した。抗原は A 型神経毒素 (0~5 ng/mL 2 倍階段希釈) を 100 μ l ずつ各ウエルに加え、37°C 2 時間反応させた。検出抗体はビオチン標識した抗 A 型神経毒素アフィニティ精製ウサギ IgG (1 μ g/well) を加え 37°C 2 時間反応させ、続いてアビチン標識ペルオキシダーゼを加え 37°C 2 時間反応させた。発色基質は α -フェニレンジアミンを用い、37°C 30 分反応後、硫酸溶液で反応を停止させ 490nm で吸光度を測定した。なお、各反応段階に PBS-Tween40 で 5 回ウエルを洗浄した。

3) サンドイッチイムノ PCR

imTag PCR キット (ケアティス社) を用い、反応はすべて専用の PCR チューブ内で行った。ビオチン化抗体での反応まではサンドイッチ ELISA と同じ反応条件で行った。以下はキットに記載されている条件に準拠して行った。ビオチン化抗体反応後、アビジンを加え、37°C 1 時間反応後、キットに添付されているビオチン化オリゴヌクレオチドを 37°C 1 時間反応させた。添付の PCR プライマーを用い PCR 反応を行い、アガロース電気泳動により PCR 産物を検出し、毒素を加えていない陰性対象で検出されるバンドとの濃淡により毒素の検出濃度を判定した。

2. イムノクロマトキット

1) 固相化抗体膜の作製

固相化用抗体の濃縮と透析：抗ボツリヌス毒素モノクローナル抗体 (1mg/mL) を分子量分画 30,000MW の遠心濃縮装置を用いて遠心濃縮し、さらに 1/15M PBS 15mL をアブライシ、同様の遠心濃縮操作を 3 回繰り返し、溶液を 1/15M PBS に置き換えた。得られた濃縮・透析溶液を 5 μ m 駒形フィルターを用いて濾過し、固相化用抗体の濃縮液とした。

固相化用抗体溶液の調製：Test ライン用固相化抗体の調整は抗ボツリヌス抗体濃度が 2mg/mL になるように 1/15M PBS を添加して、Test ライン用固相化抗体溶液とした。Control ライン用固相化抗体の調製は、抗ヒト IgG モノクローナル抗体を抗体濃度が 1mg/mL になるように 1/15M PBS を添加し、5 μ m 駒形フィルターを用いて濾過したものを Control ライン用固相化抗体溶液とした。

抗体固相化膜の作製：抗体塗布装置を用いて固相化用抗体溶液を塗布し、室温にて一晩乾燥させ、抗体を膜に固相化させた。乾燥後、抗体固相化膜とした。

2) コンジュゲートパッド (金コロイド標識抗体パッド) の作製

金コロイド標識用抗体の調製：抗ボツリヌス毒素モノクローナル抗体を 100mM 炭酸水

素カリウム緩衝溶液 pH9.0 に対して透析し、100mM 炭酸水素カリウム緩衝溶液 (pH9.0) を用いて 0.1mg/mL に希釈し、0.45 μ m フィルターで濾過したものを金コロイド標識用抗体とした。

最適標識条件の決定：クリーンなチューブ 10 本を用意して、0.1mg/mL に調製した抗体溶液を変量して分注した。金コロイド溶液を各チューブに 1 mL ずつ分注し、攪拌した後、暗所で 5 分間感作させた。感作後、各チューブに 10%NaCl 溶液を 0.1mL ずつ分注して攪拌した。5 分後の色調を観察して、青変しない最少抗体添加量を最適標識条件とした。

コンジュゲート作製：金コロイド溶液 100 mL に最適条件の抗体を添加し、感作させた。ブロッキング後、遠心分離によって感作金コロイド粒子を回収し、コンジュゲートとした。

コンジュゲートパッドの作製：コンジュゲートをガラス繊維パッドに含浸させ、風乾させたものをコンジュゲートパッドとした。

3) イムノクロマトストリップの組み立て

抗体固相化膜とコンジュゲートパッドの組み合わせを変えて Type1 から Type3 までのテストストリップを作製した。

4) 毒素の添加および判定方法

毒素は精製したボツリヌス A 型毒素を 2 系列用意した。0.2%v/w ゼラチン加 M/60 リン酸緩衝液 (pH7.0) で 100ipLD₅₀/mL から 5 倍段階希釈した 4 用量 (100-0.8LD₅₀/mL) および 100 万から 10 倍段階希釈した 5 用量 (100 万-100LD₅₀/mL) を試験に用いた。毒素液は 100 μ l をサンプル穴に滴下して室温で 5 または 20 分で判定した。陽性判定は control ラインが確認され、さらに Test ラインも確認できた場合は陽性とした。

(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) サンドイッチ ELISA の検討

ボツリヌス毒素が生物兵器として使用され

る場合、神経毒素よりむしろ L 毒素や M 毒素が使用される可能性が高い。検出系構築のためには用いる抗体が神経毒素だけでなく L および M 毒素にも反応する必要がある。今回選択した抗 A 型神経毒素モノクローナル抗体 14 クローンについて L 毒素、M 毒素との反応性を ELISA により調べた。その結果 1F11、3G2、4C10、5A6、7C5、10F4 の 6 クローンは L、M、神経毒素のいずれに対しても高い反応性を示した (表 1)。これら 6 クローンよりサンドイッチイムノ PCR における固層化抗体として最適な抗体をサンドイッチ ELISA の系を指標にして選定した (表 2)。検出感度およびバックグラウンドの低さから 1F11、5A6、10F4 の 3 抗体が固層化抗体として優れていることが明らかとなった。尚、これら 3 抗体を用いたときの A 型神経毒素に対するサンドイッチ ELISA における検出限界は 313 pg/mL でマウス接種法と比較した場合、3 ~ 30 倍感度が低かった (図 1)。

サンドイッチ ELISA を指標に選定した反応条件および抗体を用いて、サンドイッチイムノ PCR を行った (図 2)。神経毒素を加えない陰性対照における PCR 産物が予想より多かったが、5A6 では神経毒素 0.1 ng/mL における PCR 産物で陰性対照と差が見られた。1F11 では 10 ng/mL で差が見られ、10F4 ではいずれの濃度においても陰性対照とは差が見られなかった。したがって、5A6 がサンドイッチイムノ PCR の固層化抗体として最適であり、現段階での検出感度は 100 pg/mL でサンドイッチ ELISA と比較して 5 倍感度が高かった。

2) 試作イムノクロマトキット

イムノクロマトキットの判定の模式図を図 3 に示した。試作した 3 つのモデル Type 1、2 および 3 について、毒素量既知の精製 A 型ボツリヌス毒素を 100 から 0.8 マウス ipLD₅₀ を試験した結果、Type3 として組み合わせし

た条件が最も感度が高いことを確認した。毒素が 100 マウス ipLD₅₀/mL でかすかな反応線を確認したが、20 以下は陰性であった。次に 100 万から 100 マウス ipLD₅₀/mL で試験した結果、1 回目の試験と同様に 100 ではかすかな反応線が認められたが、1000 マウス ipLD₅₀/mL では明らかな反応線を確認した。この反応は観察時間が 5 分および 20 分であっても大きな違いはなかった (図 4)。

D. 考 察

サンドイッチ ELISA による固層化抗体の条件検討において、3 クローンモノクローナル抗体 (1F11、5A6、10F4) は検出感度がほぼ同様で良好な結果を示したが、サンドイッチイムノ PCR では異なった結果となった。サンドイッチイムノ PCR は感度が高く、反応のステップが多いため、サンドイッチ ELISA では現れない抗体の性状の違いが感度の低下やバックグラウンドの上昇を引き起こすと考えられる。5A6 の抗体で比較的良好な結果を得られたことから、今後はこの抗体を用いて、陰性対照の PCR 産物を減らすための検討を行う。サンドイッチイムノ PCR では陰性対照においても PCR 産物の出現は避けられない。抗体反応時に BSA のような非特異反応を抑える試薬を反応毎に添加したり、PCR 反応時に非特異的増幅を抑えるためにサケ精子 DNA を添加することで陰性対照における PCR 産物を減少させた例がある。来年度は今回決定した反応条件を基に非特異反応を抑えるための条件検討を行う予定である。

ボツリヌス毒素検出用イムノクロマトキットは標準試験法であるマウスを使用しない試験法の替わりができるかを検証することを目指しているが、現時点では実際の臨床検体の試験はあくまでスクリーニング用と位置づけている。今後、ボツリヌス毒素の検出を実施する機会のある地方衛生研究所の協力を得て、食中毒患者および乳児ボツリヌス患者のさまざまな検査材料を試験することにより、測定感度、非特異反応の出現等を検証する。

E. 結 論

1) マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度検出系としてサンドイッチイムノ PCR 法を開発するため、A 型神経毒素を指標として反応条件の検討を行った。検出感度は 100 pg/ml でマウス接種法よりは幾分低い結果となった。今後、さらに反応条件を検討し、マウス接種法より高い検出感度を得る系の確立を目指す予定である。

2) 試作したイムノクロマトキットはボツリヌス A 型毒素を 1000 マウス ipLD₅₀/mL (10ng/mL) の感度を有するために、バイオテロに使用する場合の推定毒素量 (数万マウス ipLD₅₀/mL) は検出可能である。今後、ボツリヌス食中毒患者等の検査に使用することで品質の評価を検証する。

本研究では異なる手法により毒素を *in vitro* で検出する方法の開発を目指している。現段階では、サンドイッチイムノ PCR 法が感度が勝る結果を得ているが、反面 実験室で作業が必要、非特異反応による精度に改善点がある。イムノクロマトキットは現場で簡易に使用できる利点はあるが、一次スクリーニングとしてはマウス法の代替法とするには、より多くの検証が必要である。しかし、両方法の長所、短所を取り入れて開発することにより、ボツリヌス毒素検出系の確実性がより向上すると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

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

表 1. A型モノクローナル抗体のL毒素、M毒素、神経毒素との反応性

		Clone No. (OD490)						
		1B11	1D4	1F10	1F11	3B5	3G2	4C10
L毒素	(33 ng/ml)	0.108	1.056	0.395	2.836	0.318	1.369	2.121
M毒素	(20 ng/ml)	0.517	1.143	0.513	2.741	0.235	1.888	2.314
神経毒素	(10ng/ml)	0.336	1.512	2.101	3.105	1.983	2.236	3.025

		Clone No. (OD490)						
		4E7	5A6	7C5	8G1	10F4	11B3	12H7
L毒素	(33 ng/ml)	0.855	2.645	1.636	0.263	2.446	0.725	0.925
M毒素	(20 ng/ml)	1.025	2.713	1.875	0.351	2.831	0.819	1.003
神経毒素	(10ng/ml)	1.222	3.362	2.512	1.017	3.412	0.462	1.544

サンドイッチELISAにより評価

各クローンの精製モノクローナル抗体を固層化抗体として使用

検出抗体はビオチン標識ポリクローナル抗体

表 2. サンドイッチELISAにおける固層化抗体の選定

A型神経毒素	固層化抗体 (Clone No.)					
毒素量 (ng/ml)	1F11	3G2	4C10	5A6	7C5	10F4
5	3.423	1.618	2.974	3.296	1.685	3.306
2.5	2.256	0.809	1.775	2.154	0.872	2.359
1.25	1.420	0.406	1.026	1.257	0.452	1.279
0.625	0.713	0.223	0.513	0.647	0.228	0.663
0.313	0.375	0.131	0.328	0.331	0.119	0.401
0.156	0.208	0.088	0.257	0.208	0.072	0.231
0	0.052	0.057	0.178	0.084	0.043	0.092

図1. サンドイッチELISAでのボツリヌスA型神経毒素の検出感度

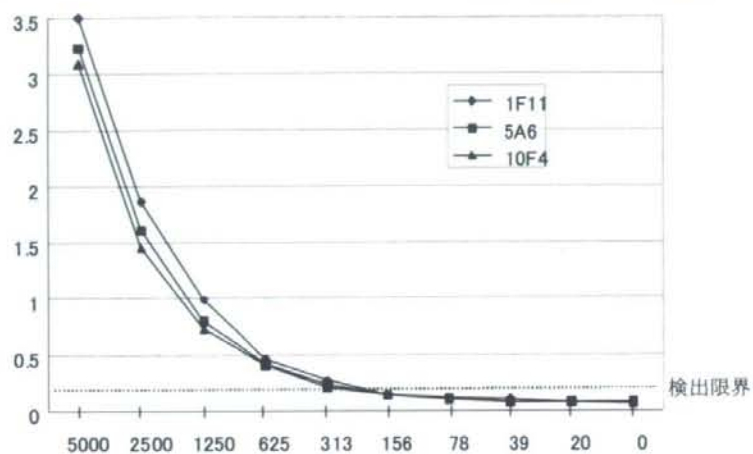


図2. サンドイッチタイムPCRによるボツリヌスA型毒素の検出

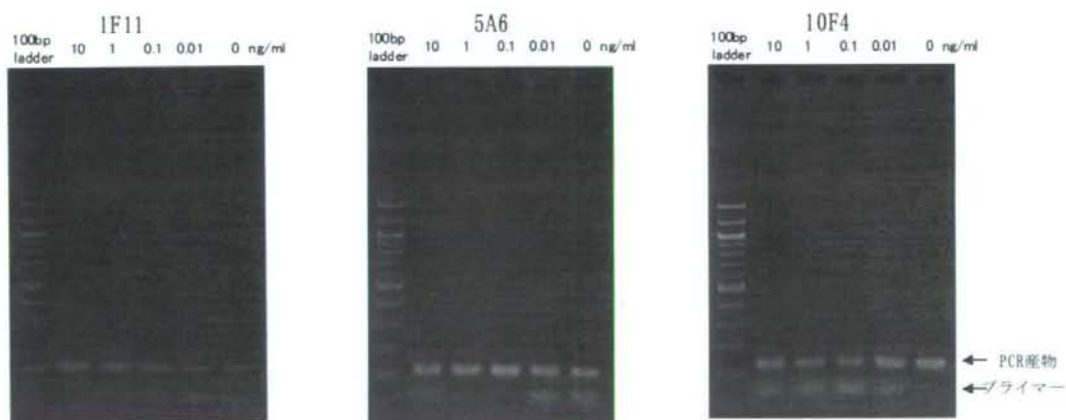


図3. 試作イムノクロマトキットの判定模式図

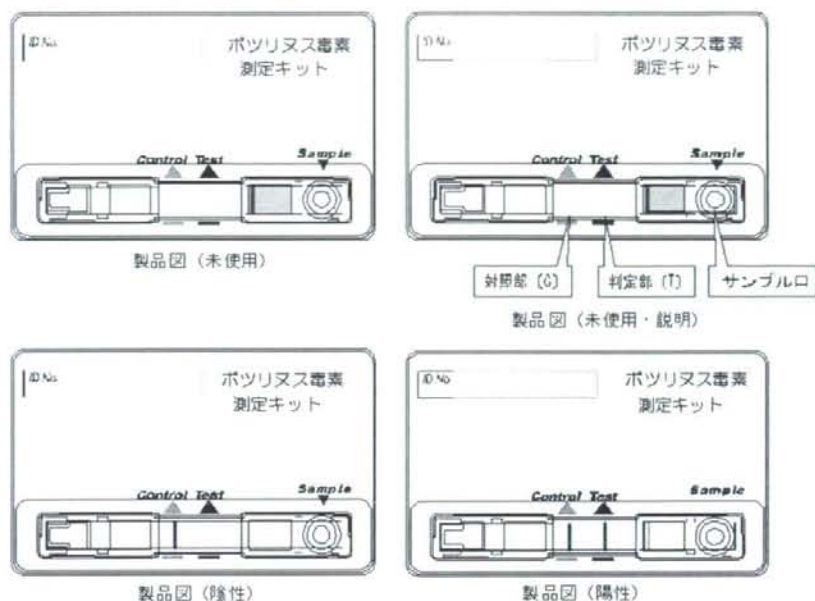
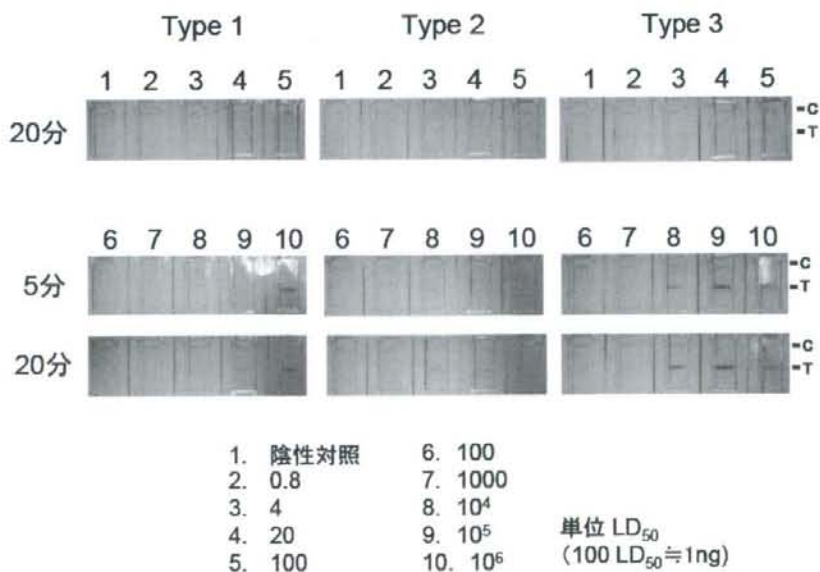


図4. 試作イムノクロマトキットの試験成績
—毒素量と反応時間—



8. リケッチア・コクシエラ・クラミジアの迅速診断法の開発

研究分担者	安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	主任研究官
研究協力者	岸本壽男	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	室長
	花岡 希	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	流動研究員
	松谷峰之介	山口大学医学部・微生物学講座	研究員
	坂田明子	国立感染症研究所ウイルス第一部第五室	非常勤職員
	白井睦訓	山口大学医学部・微生物学講座	教授

研究要旨 リケッチア属、クラミジア属は、生物テロに使用される可能性がある病原体であるが、患者発生時における高感度かつ迅速な検出法、診断法は確立されていない。これまでのリケッチア感染症の検査方法では、リケッチア属全般を迅速に検出する方法は確立されておらず、病状や感染地域から推測されるリケッチア種に対して診断検出をおこなっている。しかしながら、リケッチア、クラミジアを用いたバイオテロにおいては、属を決定することで迅速に治療方針や防除対策が行えるため、リケッチア属やクラミジア属を全般的に検出できる方法が望ましいと考えた。本研究では、リケッチア属感染、クラミジア属感染を早期に識別する方法の開発を目指した。これまで報告されている検出法やゲノム情報を用いて、属検出 PCR 法の開発及び適応を目指している。これらの方法の確立は、菌種が使用された疑いがある患者発生時における、効果的な早期治療と被害拡大防止に欠かさない。本年度は、*R. japonica* のゲノム情報を含む 13 種のリケッチア菌種間の全ゲノム情報を解析、オルソロググループの抽出に成功し、リケッチア属のみに高度の保存されている特異的な遺伝子配列群として 10 のオルソロググループを同定した。さらに、詳細な Blast 検索によって、6 つのオルソロググループ内に特異的な DNA 検出領域を見出し、高感度検出法への応用が期待される。

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。バイオテロ発生時において、原因微生物の属を迅速に決定できれば、治療方針や感染源、防除方法を迅速に進めることができる(図1)。そこで本研究ではリケッチア、クラミジア、コクシエラ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ている。本年度では、すでに同定法や診断法の開発が進んでいるクラミジア属を除き、リケッチア属を特定できる検出法や診断法を開発し実用化すれば、治療方針や感染経路等が迅速に予測でき、それによって効果的な治療と被害拡大防止、さらにテロの抑止につながると考え、バイオテロにおいてどのような菌が材料に使用されているのかの推測を迅速に判別する検出系の開発を目指した。

B. 研究方法

1) 共通遺伝子の同定法

a) 総当たり BLAST 検索

既に完全長ゲノム配列が報告されている 12 菌(図2)に山口大学と共同で解析を進めているリケッチア・ジャポニカの全ゲノム配列を加えた 13 菌種間全てで共通な遺伝子群を抽出した。最初にアミノ酸レベルですべて菌の組み合わせにおいてオルソログ(共通遺伝子)の解析を行った。それぞれの菌の全アミノ酸配列から計 13 のデータベースを作成し、自身以外の全てに対して総当たりの BLAST 検索(アミノ酸配列)を連続的に実施した。新規に解析したゲノム情報の漏洩を防ぐためにデータベース構築および BLAST 検索は全てローカルコンピュータ内に Linux システム(<http://www.centos.org>)を構築して実行した。BLAST の実行プログラムおよび既知のリケッチアゲノム情報は全て NCBI の FTP サーバ(<ftp.ncbi.nih.gov>)より取得した。

b) オルソロググループの構築

互いの菌の全アミノ酸配列に対してトップヒット(E-value $\leq 1.0E-10$)でかつ互いの全長の 80%

以上をカバーする組み合わせをオルソログとした(図2)。全ての菌の組み合わせにおいてこの条件を満たしている場合をオルソロググループとして定義した。これらの解析は全て自作のプログラムにより行った。

2) プライマー及びプローブ部位の検索

a) 得られた ORF アライメントから得た情報を元に、PrimerExplorer V4 (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)、Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて LAMP primer、TaqMan probe 及び TaqMan MGB probe 検出部位を探索した。

b) 候補となったプローブ部位やプライマー部位について、再度 NCBI の BLAST 検索 (blastn: Word Size 7, DUST Filter Setting OFF, Expect Value1000) を実行した(図4)。

C. 研究結果

1) オルソロググループの構築

13 菌間の全ての組み合わせにおいて全長の 80%以上をカバーする 211 のグループを同定した(図2)。

2) オルソロググループの他菌種に対する相同性検索

同定した 211 のグループのうちリケッチャ・ジャポニカを除く 2332 個の ORF の塩基配列について NCBI の BLAST サーバに対してネットワーク経由で BLAST 検索を実行した。既知の全ての配列情報から重複を除いて作成されている nt データベースを検索対象とした。オルソロググループ以外にヒットがない(E-value $\leq 1.0E-5$)を同定した(図2)。

3) オルソロググループの配列アラインメント

同定した 10 のオルソロググループについてそれぞれ配列アラインメント (CLUSTALW を使用) を実施して保存されている領域を同定した(図3)。

4) プライマー及びプローブの設計

抽出された 10 のオルソロググループの中で、*Rickettsia conorii* の配列情報を利用し、抽出された 10 個の ORF に対して、blastn によって明らかとなった非特異的な配列部位を除外した(図4)。その結果、10 のオルソロググループの中から、6 つのオルソロググループがリケッチャ属に特異性の高い DNA 配列領域を有していることが明らかとなった。さらに、PrimerExplorer、Primer Express software を用いて、複数のターゲット部位を選定した後、13 菌種間で同一性が高く、検

出に支障をきたさないと考えられるプライマー及びプローブの組み合わせを見い出した。

D. 考察

これまで公開されているゲノム情報や我々が解析を進めているゲノム情報を含めて利用し、リケッチャ属特異的な ORF を選択した。13 種のリケッチャ属菌種間で保存されているオルソロググループは 211 存在した。この中で、リケッチャ属特異的なものは 10 グループであった。

オルソロググループ作製には ORF を用いているため、アミノ酸配列に依存して、ヒト、マウスや他の菌種の遺伝子配列断片と相同な部分を含む。そのため、最終的には公表されているすべての遺伝子断片情報を含めた、blast を行った。Nucleotide blastn は非常に“ゆるい”Blast であるが、リケッチャ属に特異性の高い DNA 領域を選抜するためにこの方法を用いた。

E. 結論

新規に解読を行った *R. japonica* のゲノム情報を用いた結果、これまでにない 13 種のリケッチャ属菌種間でのオルソロググループの抽出に成功した。リケッチャ属のみに高度の保存されている特異的な遺伝子配列群として 10 のオルソロググループを同定した。さらに、DNA 検出のための方法として、LAMP 法、TaqMAN 法、TaqMAN MGB 法を選択し、各々プライマー及びプローブを検討した。

詳細な Blast 検索によって、6 つのオルソロググループ内に特異的な DNA 検出領域を見出すことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, and Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. Microbiology and Immunology. (In press)
- 2) Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Ando S, Takano A, Watanabe H, Kawabata H. *Rickettsia* sp. In *Ixodes granulatus* ticks, Japan. Emerging Infectious Diseases, 14: 1963-1965, 2008
- 3) Yamazaki T, Takemura H, Inoue M, Ogawa M, Ando S, Sato K, Kishimoto T, The