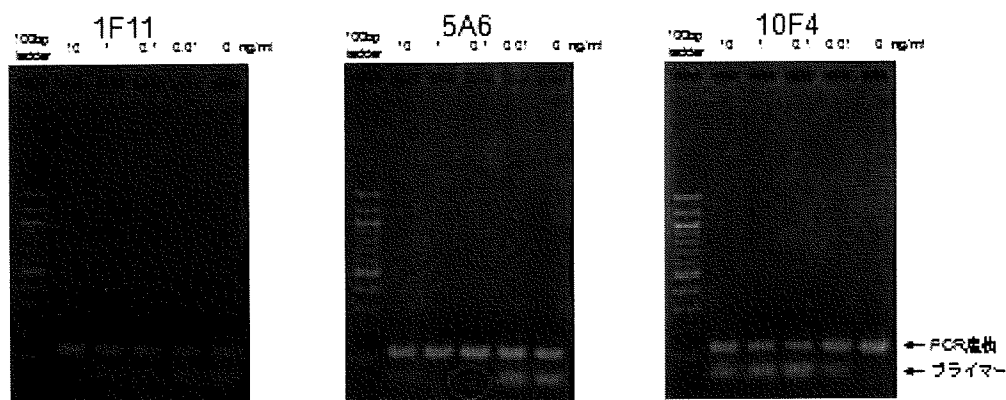
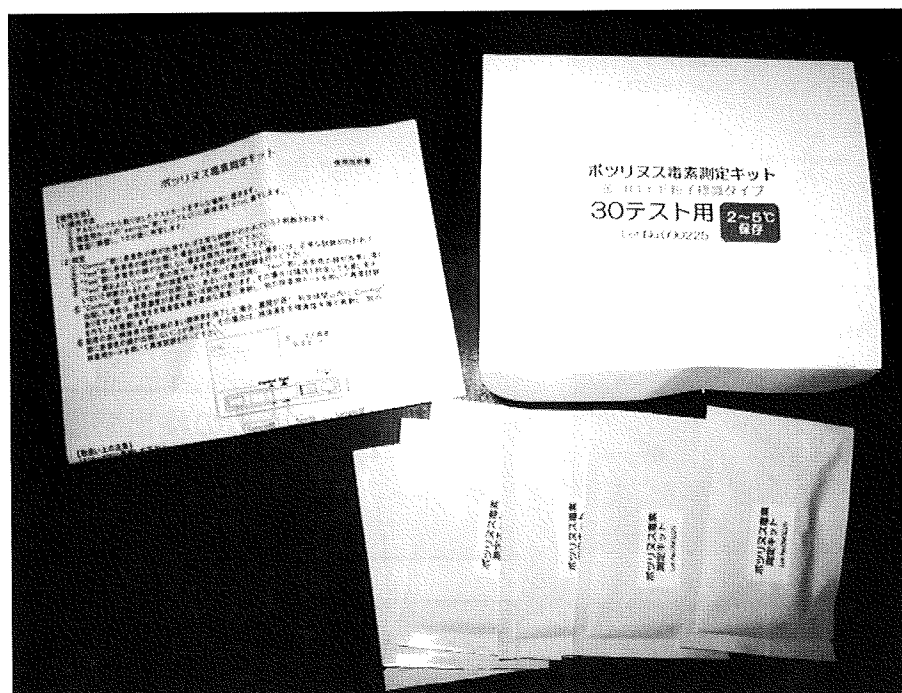


サンドイッチイムノPCRによるボツリヌスA型毒素検出系の構築

固着化抗体 抗A型神経毒素マウスモノクローナル抗体 (1F11, 5A6, 10F4)
検出抗体 ビオチン標識抗A型神経毒素アフィニティ標識ウサギIgG
評価抗原 精製A型神経毒素 (62A) 0.5~5,000 pg/ml 10倍倍戻冷取で使用
PCR用Taq EX-Taq (TAKARA)
反応条件等 はキット記載の方法に準拠

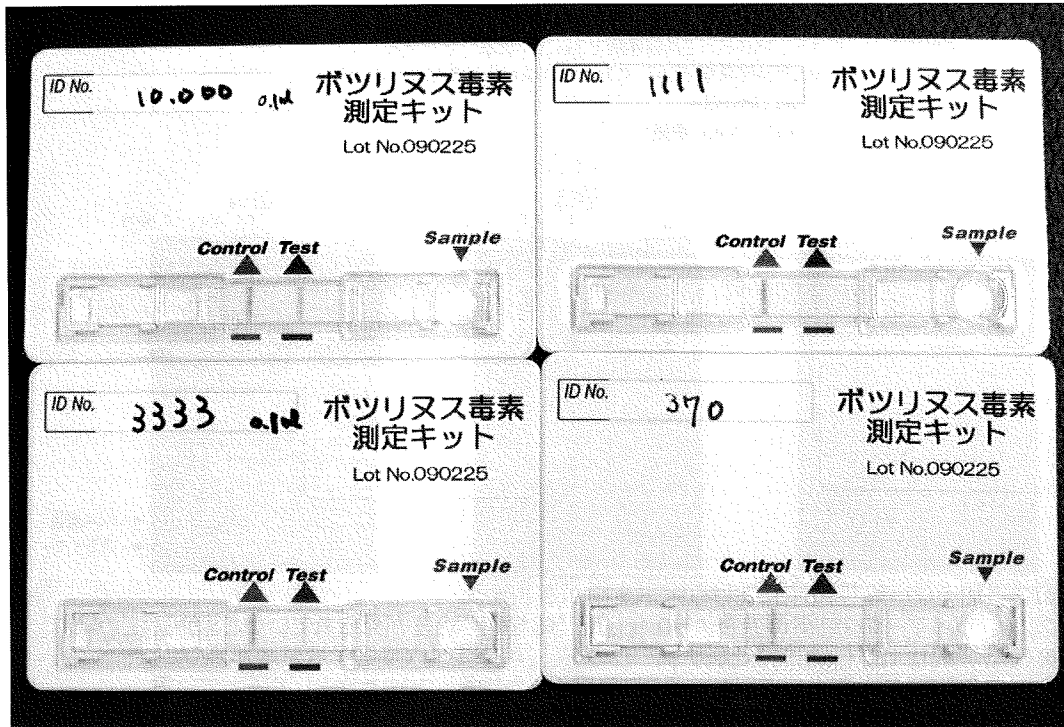


神経毒素を加えない陰性対照におけるPCR産物が多すぎる。
 5A6では、プライマーのバンドの濃度より0.1ng/mlで陰性対照と差が見られていることから、この条件での検出感度は100 pg/mlであり、サンドイッチELISAと比較して5倍程度感度が高くなった。プライマー部分でバンドがないことは、PCRに使用された結果、PCR産物として現れている。今後は、ブロッキング等の反応条件を再検討する。

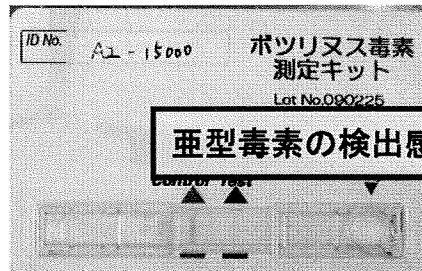
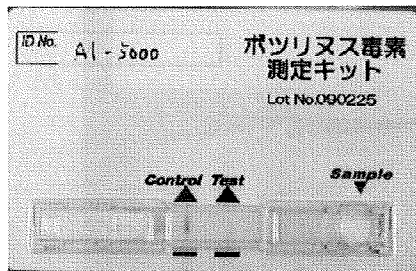
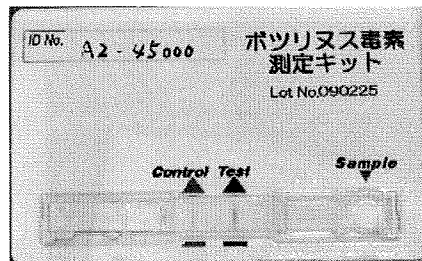
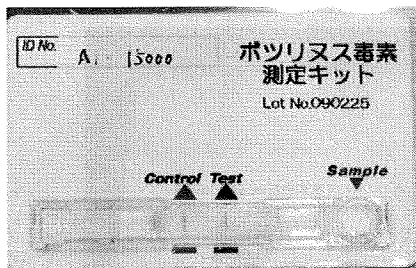


試作 A 型ボツリヌス毒素検出用イムノクロマトキット

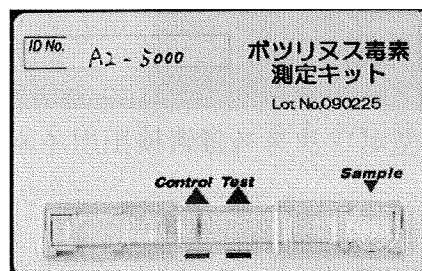
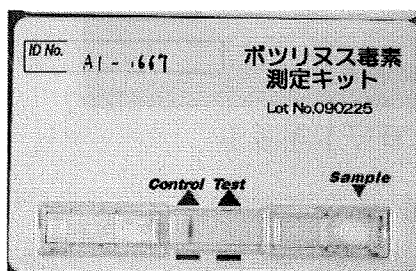
A1精製毒素(M)の検出感度



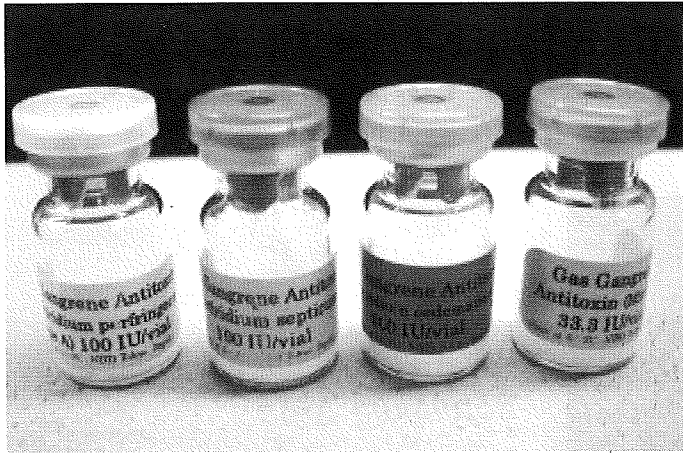
A1とA2(亜型)の精製毒素(M)の検出比較



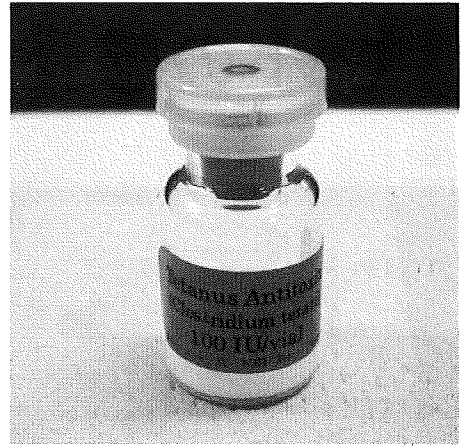
亜型毒素の検出感度は1/3である



A



B



A: 凍結乾燥した *C. perfringens*, *C. septicum* 及び *C. oedimatiens* の毒素に対する抗毒素抗体標品と 3 種混合抗体

B: 凍結乾燥した破傷風抗毒素抗体

バイオテロ対策ボツリヌス毒素検出 キットの感受性および特異性試験



For the rapid identification of
Botulinum Toxin.

Warning: Not for in vitro diagnostic use.

This Kit Contains:

- 25 Bot Tox *BioThreat Alert™* Tests
- 5 Cotton-tipped Swabs
- 5 Collection Vials
- 12 milliliters of *BioThreat Alert™* Sample Buffer

テトラコア (Tetracore) 社製
BTA テストストリップス (生物剤検知チケツト) キット
取 扱 説 明 書

(08.03)

帝 国 織 維 株 式 会 社

東京都中央区日本橋 2-5-13

Botulinum toxin BioThreat Alert Tetracore 検出感度試験

2009.9.19実施

- 毒素** ボツリヌスA型菌(A1 62A)をTPYG培地で培養後、上清の毒素を精製したM型毒素を用いた。
- 方法** 添付の説明書に従い、希釈した毒素液500 μ lを同梱のサンプルバッファー500 μ lと混合し、10秒間転倒混和した。マイクロピペットにて混合液150 μ lをテストストリップのサンプルポートへ滴下した。各毒素濃度につき2個のテストストリップを使用した。滴下後15分後に目視判定した。陰性対照には生理食塩水のみを滴下した。
- 結果** サンプル滴下後、約3-4分でコントロールラインの着色が確認された。
陽性を示すバンドの着色は滴下後、約12分程度で確認された。
テストラインのバンドは10,000LD₅₀/mlの毒素液で認められたが、1,000LD₅₀/mlでは認められなかった。
コントロールラインに比較して陽性でもテストラインは薄く、判定しにくかった。(写真)

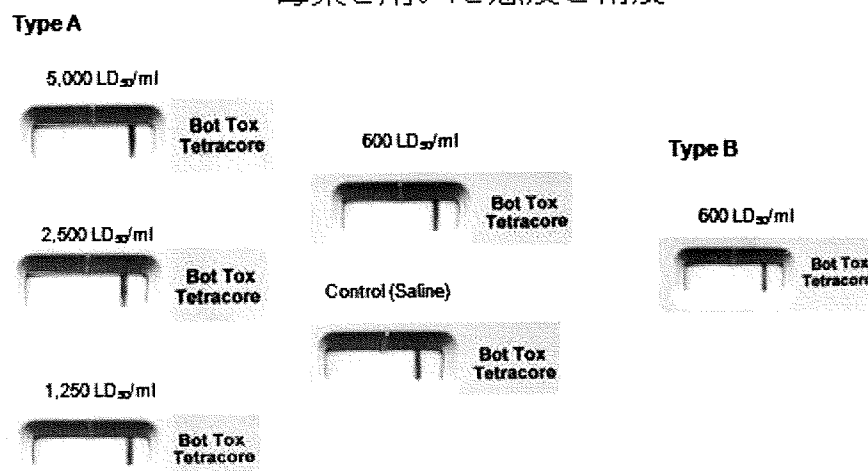


Botulinum toxin BioThreat Alert Tetracore 検出感度試験

2009.9.19実施

- 毒素** ポツリヌスA型菌およびB型菌をTPYG培地で培養後、上清の毒素液を濾紙ろ過して用いた。
- 方法** 添付の説明書に従い、希釈した毒素液500 μ lを同梱のサンプルバッファー500 μ lと混合し、10秒間転倒混和した。マイクロピペッターにて混合液150 μ lをテストストリップのサンプルポートへ滴下した。各毒素濃度につき2個のテストストリップを使用した。滴下後15分後に目視判定した。陰性対照には生理食塩水のみを滴下した。
- 結果** いずれもサンプル滴下後、約3-4分でコントロールラインの着色が確認された。陽性を示すバンドの着色は滴下後、約12分程度で確認された。A型毒素の検出試験では、テストラインのバンドは5,000LD₅₀/mlの毒素液で認められたが、2,500LD₅₀/mlでは認められなかった。B型毒素の検出系では、600LD₅₀/mlの毒素液でバンドは認められなかった。
- コントロールラインに比較して陽性でもテストラインは薄く、判定しにくかった。(写真)

菌培養上清中の毒素を用いた感度と精度



まとめ:

- ・キットの感度は、試験する材料の違いで、菌培養液または精製毒素で約100倍異なった。(5,000 LD₅₀または500,000 LD₅₀)
- ・キットの特異性は、A型毒素以外にB型毒素との交差反応は認められなかった。
- ・不明瞭な判定には別途販売されているリーダーを必要とするために、汎用性が劣ることが予想される。
- ・試験に用いる緩衝液が反応に及ぼす影響が大きいと記載されているために、環境検体の調整が困難な場合が予想される。

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
研究協力者	花岡 希	(国立感染症研究所)	ウイルス第一部第五室)
	松谷峰之介	(山口大・農・生物機能科学,	院・医・ゲノム・機能分)
	坂田明子	(国立感染症研究所)	ウイルス第一部第五室)
	岸本寿男	(岡山県環境保健センター)	
	東 慶直	(山口大・院・医・ゲノム・機能分)	
	白井睦訓	(山口大・院・医・ゲノム・機能分)	

研究要旨 *Rickettsia* 属病原体は生物テロに使用される可能性がある特定病原体であるが、患者発生時における高感度かつ迅速な検出法、診断法は十分には確立されていない。本研究では、①昨年度より進行している *Rickettsia* 属を早期に識別する方法の開発及び②*R. japonica* の迅速診断法を開発を目指した。TaqMAN プローブを用いた Real-time PCR 法を適応させ、開発した検出系は 100 コピーの標的 DNA を 40 分以内で検出することができ、特異性も高かった。次年度はキット化への対応や地方衛生研究所などと協力し、導入を目指していく。

A. 研究目的

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、防除方法等を迅速に進めることができる。我々はゲノム DNA を標的とした迅速検出系の開発を目指している。本年度では、①昨年度より進行している *Rickettsia* 属検出法の開発と②*R. japonica* 特異的 DNA 領域を利用した TaqMAN MGB 法を適応させ、*R. japonica* 特異的迅速系の開発を行った。

B. 研究方法

1) *Rickettsia* 属検出法の開発

1. オルソロググループの解析

昨年度抽出した 10 種類の *Rickettsia* 特異的なオルソロググループ (ID 番号、3.43.77.115.125.126.158.164.167.175) の中から、特に①プライマー設計部位の共通性の高いもの、②検出部位の特異性の高いものを検出部位の Blast 検索及び目視で抽出した。

2. Real-time PCR

抽出したオルソロググループの 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。蛍光物質として 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)。Real-time PCR 反応には Ex premix taq(Perfect Real Time)[TAKARA]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 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 Stage 2 を 40 回繰り返す反応サイクルを設定した。

また、二つのプライマー・プローブセットを組み合わせた反応組成を表 2 に示した。PCR 反応サイクルは上記と同様である。

加えて、Ex taq[TAKARA]を用いた通常の PCR 法の反応組成を表 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 Stage 2 を 30 回繰り返した後に、72°C 3 分反応させた。

2) *R. japonica* 特異的 Real-time PCR の開発

1. 山口大学と共同で解析を進めている *R. japonica* ゲノム情報を元に、TaqMAN MGB probe 作製のために、*R. japonica* に特異的な ORF を BLAST 検索 (NCBI site) し抽出した。Primer express ver.2.0[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。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 FAM を用いた。

2. DNA シークエンス

DNA シークエンスには ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて ABI 3130 で行った。ClustalW 解析は、open-gap penalty が 15、gap-extension penalty

が 6.66、gap distance が 8 で、maximum division penalty が 40 のパラメーターで行った。

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

1) *Rickettsia* 属検出法の開発

1. Real-time PCR

a) プライマー、プローブの選定：

候補となったプローブ部位やプライマー部位について NCBI の BLAST 検索を実行した。その結果、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出した。

b) Real-time PCR スクリーニング結果：

作製した各種プライマー・プローブセットの検出感度測定は、1.*R. asiatica*, 2.*R. canadensis*, 3.*R. conorii*, 4.*R. helvetica*, 5.*R. honei*, 6.*R. japonica*, 7.*R. prowazekii*, 8.*R. rickettsii*, 9.*R. siberica*, 10.*Rickettsia* sp. Arj, 11.*Rickettsia* sp. In56, 12.*Rickettsia* sp. LON, 13.*R. tamurae*, 14.*R. typhi*, 15.*R. heilongjiangensis*, 16.Human, 17.Mouse のゲノム DNA を用いてスクリーニングを行った。表 4 に結果をまとめた。Probe ID は各 ORF に対するプライマー・プローブセットを示す。Probe ID 164_1 が幅広く試験したすべてのリケッチアを検出することが出来た。また、Typhus 群のみを検出するプローブセット (ID:115_2) や、Typhus 群以外すべてを検出するプローブセット(175_1)も見いだした。一方、Probe ID 164_1 が Typhus 群に対して感度が低かったため、Typhus のみを検出する 115_2 プローブセットと 164_1 プローブセットを組み合わせて検出感度の検討を行った。表 2 に示した反応組成で行った結果を表 5 に示す。115_2 と 164_1 の組み合わせにより、試験したすべてのリケッチアを特異的かつ高感度に検出することが出来た。

c) Real-time PCR 検出感度測定：

詳細な検出感度を調べるために、ORF ID 164 のリアルタイム PCR 検出部位を合成しコピー数算出用 DNA テンプレートとして使用した (標準曲線の作製)。

また、ORF ID 164 を増幅するようなプライマーを作製し、PCR 反応によって増幅後、精製して回

収したものと、ゲノム DNA そのものを上記のコピー数検出用標準曲線を利用し、コピー数算出後、検出用 DNA テンプレートとした。DNA 希釈溶液として、チューブへの DNA 吸着を緩和するため、100 μg/ml のシャケ精子 DNA を含む TE バッファーを用いた。

合成 DNA を 1000 コピー、100 コピー、10 コピー、1 コピーと段階的に希釈系列を作製し、Real-time PCR を実施した結果、1 コピーまで検出できた (図 1)。また 40 分以内に 100 コピーの DNA を検出できた。

2) *R. japonica* 特異的迅速系の開発

1. *R. japonica* 特異的領域の決定

R. japonica ゲノム解析より、*R. japonica* には 2 つの特異的な DNA 領域が存在することが明らかとなった (Region-1: 約 5kb ORF、Region-2: 約 200bp の複数の ORF を含む) (Data not shown)。本研究では DNA 配列の短い Region-1 に着目し、ゲノム上の位置を確認するためにマップ解析の進んでいる *R. conorii* とゲノムマップ比較を行った (図 2)。その結果、*R. japonica* Region-1 は *R. conorii* RC1338 ホモログ中に挿入された形で存在した。

Region-2 がゲノム解析で使用した菌株だけではなく *R. japonica* の複数の株間で保存されているのかを調べるために、*R. japonica* の YH 株、DT-1 株、FLA-1 株、HH-8 株、HH9 株、HH-12 株、HH13 株の DNA シークエンスを行った。DNA シークエンスは、JapoSP5 (5'-ACAACATCAATATTATAATTAGTATCC-3') と JapoSP3 (5'-TTCACGTATGTCTATATATGCTGCAGCG-3') を用いて、PCR で増幅させた約 500bp の DNA 断片を利用して行った。得られた DNA 配列情報を ClustalW で解析した結果、すべての供試 *R. japonica* 株間で Region-2 が完全に保存されていることが明らかとなった (図 3)。

2. Real-time PCR

a) Primer の設定：

Primer express を用いてこの領域にプローブ及びプライマーを設計した。得られた配列を再度ブラスト検索し特異性の高いプライマーセットを抽出した。プライマー配列及びプローブ配列部位を図 3 に示した。

b) PCR 反応性試験：

作製したプライマーを用いて、TaqMAN MGB probe を用いた Real-time PCR の反応性試験を行った (図 4)。DNA シークエンスに使用した DNA 断片を鋳型とし、推定コピー数を算出した。濃度は分光高度計 (ND-1000 Spectrophotometer [NanoDrop]) を用いて測定した。

開発した Real-time PCR は、100~10⁹ コピーの間で R>0.99 の反応性を示した。また、100 コピーの検出サイクルは約 40 サイクルであった (図 4)。

c) 感度比較試験：

感度の比較試験では Conventional な PCR 診断系として R1-R2 アッセイ法と比較検討した (表 6)。図 4 で作製した標準曲線を元に *R. japonica* ゲノム DNA 中の推定 DNA コピー数を算出し、鋳型 DNA として用いた。その結果、R1-R2 アッセイは 10⁴ コピーの *R. japonica* ゲノム DNA が検出可能であり、Real-time PCR 系は 100 コピー DNA が検出可能であった。R1-R2 アッセイと比較して *R. japonica* real-time PCR は 100 倍感度が高かった。(表 6)。

d) PCR 特異性試験：

様々なケッチア菌種に対して、*R. japonica* Real-time PCR を実施したところ、*R. japonica* 株のみ検出され、特異性は 100% であり、近縁種である LON type は検出されなかった (表 7)。

e) 臨床サンプルを用いた試験：

実際の臨床サンプルを用いて、診断系への適応を検討した。臨床サンプルは、血清診断において日本紅斑熱と確定された患者由来の血餅から抽出した DNA を用いた。また、Conventional PCR として、R1-R2 だけではなく、Rj5-Rj10 アッセイも同様に比較した (表 8)。使用した日本紅斑熱患者材料は Male: Female=1:1、平均年齢 64.1 歳 (27~88 歳)、採取日が発熱から平均 4.6 日 (2-7 日) であった。新規に開発した TaqMAN PCR は Conventional PCR で検出できなかった 18 例中 9 例で *R. japonica* DNA を検出できた (表 8)。

D. 考 察

1) *Rickettsia* 属検出法の開発

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から選択した *Rickettsia* 属特異的な 10 個のオルソロググループ

に対して、Real-time PCR 法を適応した。Real-time PCR 系では *Rickettsia* 属を全般的に迅速かつ高感度で検出できた。また、Typhus 群のみ検出できるプローブセットや、Typhus 群を検出できないプローブセット等も見いだし、今後のスクリーニング系の開発に期待が出来る。

2) *R. japonica* 特異的迅速系の開発

R. japonica のゲノムに特異的な約 200bp の ORF Region-2 は、供試した *R. japonica* の 7 株間で完全に保存されていた。また、TaqMAN MGB 法は非常に特異性の高いハイブリダイゼーションであるため、特異性試験結果はこの領域が *R. japonica* にのみ保存されている領域であることを示唆している (表 7)。新規に開発した検出系の感度は従来の PCR 法と比較し、少なくとも 100 倍程度高感度であった。また、通常の 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。試験した *Rickettsia* spp. の中で、*R. japonica* のみ検出でき、近縁種である LON type は検出しないことから本検出系は非常に特異性の高い検出系である。また、Conventional PCR では検出できなかった臨床材料からも検出できた。

今後はこれまで開発した検出系を組み合わせたスクリーニング系の検討や、地方衛生研究所等と協力し、実際の現場で使用できるプロトコルの開発及びキット化への対応を目指していく。

E. 結 論

Rickettsia 属に特異的な遺伝子配列群 (オルソロググループ) に対しての DNA 検出法として TaqMAN 法、TaqMAN MGB 法を選択し、各々プライマー及びプローブを検証した。様々な *Rickettsia* 種の DNA を用いて検討した結果、Real-time PCR 法では、50 分以内に検出できる系を開発した。

加えて、これまで開発の遅れていた日本紅斑熱 *R. japonica* 迅速診断系として特異性の高い TaqMAN MGB Real-time PCR 系を新たに開発した。この *R. japonica* 特異的診断系は、約 50 分以内に *R. japonica* ゲノム DNA を検出でき、高感度で、高い特異性を示した。また、Conventional PCR では検出できなかった日本紅斑熱患者由来の臨床サンプルからも *R. japonica* DNA が検出でき、迅速かつ簡便な本システムは臨床への応用が期待できた。

今後は、現在開発・評価中の LAMP 法も含め、これまで開発した検出系をまとめ、キット化、現場での評価を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata S, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, Ando S. Diagnostic Assay for *Rickettsia japonica*. Emerging infectious diseases, 15:1994-7, 2009.

2. 学会発表

- 1) 岸本寿男, 吉 林 台, 猪熊 壽, 花岡 希, 坂田明子, 小川基彦, 安藤秀二, 福士秀人, 大屋賢司, 野村彩朱, 矢野竹男, Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2009 年 11 月, 東京
- 2) 松谷峰之介, 東慶直, 小川基彦, 花岡希, 川端寛樹, 倉根一郎, 安藤秀二, 岸本寿男, 白井睦訓. 日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2009 年 11 月, 東京
- 3) 花岡希, 松谷峰之介, 川端寛樹, 山本正悟, 藤田博己, 坂田明子, 東 慶直, 小川基彦, 岸本寿男, 白井睦訓, 倉根一郎, 安藤秀二. 病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用. 第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会, 2009 年 11 月, 東京

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 Real time PCR 反応組成1

	使用量
Premix Ex Taq (2×)	10 μl
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl
TaqMan probe (10 μM)	0.4 μl
ROX Dye II (50×)	0.4 μl
template	1.5 μl
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	6.9 μl
Total	20 μl

表3 通常の PCR 法

	使用量
Extaq PCR buffer (10×)	5 μl
Forward Primer (100 μM)	0.5 μl
Reverse Primer (100 μM)	0.5 μl
dNTPs (各2.5mM)	4 μl
template	1 μl
Extaq	0.5 μl
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	38.5 μl
Total	50 μl

表2

Real time PCR 反応組成2

	使用量
Premix Ex Taq (2×)	10 μl
164_5' Primer (10 μM)	0.4 μl
164_3' Primer (10 μM)	0.4 μl
115_2_5' Primer (10 μM)	0.4 μl
115_2_3' Primer (10 μM)	0.4 μl
164 probe (10 μM)	0.4 μl
115_2 probe (10 μM)	0.4 μl
ROX Dye II (50×)	0.4 μl
template	1.5 μl
dH ₂ O (滅菌蒸留水)	5.7 μl
Total	20 μl

表4 Real-time PCR 結果*

Probe ID	Template ID																	判定結果
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
77_1	○	×	○	○	○	○	×	○	○	×	○	○	○	×	○	×	×	×
115_1	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	○	×	×	×
115_2	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	×	prowazekii, typhiのみ	
126_1	○	×	○	○	○	○	×	○	×	○	○	○	○	×	○	×	×	×
126_2	×	○	○	○	○	○	×	×	○	×	○	○	○	○	○	×	×	×
164_1	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	△	○	×	×	○
167_1	○	×	○	○	○	○	×	○	○	○	×	○	×	×	○	×	×	×
175_1	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	×	○	×	×	prowazekii, typhi以外
126_MGB	○	△	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	×	×	△
164_MGB	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×

*使用したプローブ間での相対的感度；○：高感度で検出，△：低感度で検出，×：検出不可

表 5 二つのプローブを組み合わせた Real-time PCR 結果*

Probe ID	Template ID																	判定結果
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
115_2 +164_1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	◎

* 使用したプローブ間での相対的感度 ; ○ : 高感度で検出, △ : 低感度で検出, × : 検出不可

表 6 感度比較

Method	Sensitivity ^{*1}
R1-R2 assay	10 ⁴
<i>R. japonica</i> Real-time PCR	10 ²

*1: Putative DNA copy number in Genomic DNA

R1-R2 assay; Conventional PCR

表 7 *R. japonica* Real-time PCR の結果

<i>Rickettsia</i> species (Strain)	Result
Isolated from ticks	
<i>Rickettsia japonica</i> (DT-1, FLA-1, HH-8, HH-9)	+
<i>Rickettsia asiatica</i> (IO-1, IO-2, IO-3, IO-25, IO-38)	-
<i>Rickettsia helvetica</i> (IM-1, IP-1, IP-2, IP-6)	
<i>Rickettsia honei</i> (TT-118)	
<i>Rickettsia tamurae</i> (AT-1, AT-4, AT-13)	
<i>Rickettsia</i> sp. (LON-2, LON-9, LON-13)	
Isolated from humans	
<i>Rickettsia japonica</i> (YH)	+
<i>Rickettsia prowazekii</i> (breinl)	-
<i>Rickettsia rickettsii</i> (Sheila Smith)	-
<i>Rickettsia conorii</i> (Malish7)	-
<i>Rickettsia siberica</i> (246)	
<i>Rickettsia typhi</i> (Wilmington)	

-: positive; -negative; not detected

* Blood clot was prepared from whole blood which was corrected from days after onset of fever

†. Serconversion determined the patient to seropositive

‡ Not tested

表 8 日本紅斑熱患者由来の DNA サンプルを用いた検定結果

Patient no.	Age, y:sex	Days after onset of fever†	Laboratory examinations				
			<i>Rickettsia</i> isolation‡	Serodiagnosis§	Conventional PCR		Real-time PCR¶
					Rj5-Rj10 assay	R1-R2 assay	
C1	83:F	5	+	+	-	-	38.2 ± 0.6
C2	35:F	6	+	+	-	-	-
C3	70:M	6	+	+	-	-	37.6 ± 1.3
C4	71:M	3	+	+	-	-	-
C5	66:F	6	+	+	-	-	38.4 ± 1.0
C6	49:M	3	NT	+	-	-	-
C7	88:F	5	NT	+	-	-	40.7 ± 0.4
C8	49:M	7	NT	+	-	-	31.4 ± 1.1
C9	65:F	3	NT	+	-	-	36.0 ± 0.5
C10	78:M	4	NT	+	-	-	39.0 ± 0.8
C11	72:F	4	NT	+	-	-	-
C12	68:F	5	NT	+	-	-	-
C13	27:M	5	NT	+	-	-	-
C14	45:M	7	NT	+	-	-	-
C15	76:F	5	NT	+	-	-	39.0 ± 0.5
C16	79:M	3	NT	+	-	-	39.9 ± 1.0
C17	69:M	2	NT	+	-	-	-
C18	64:F	3	NT	+	-	-	-

*+, positive; NT, not tested; -, not detected

†Blood clot was prepared from whole blood at indicated days after onset of fever

‡Isolation from whole blood specimens

§Seroconversion was identified by the indirect immunofluorescent test with paired serum specimens

¶Cycle threshold values are given as means ± standard errors of the means for 3 independent assays

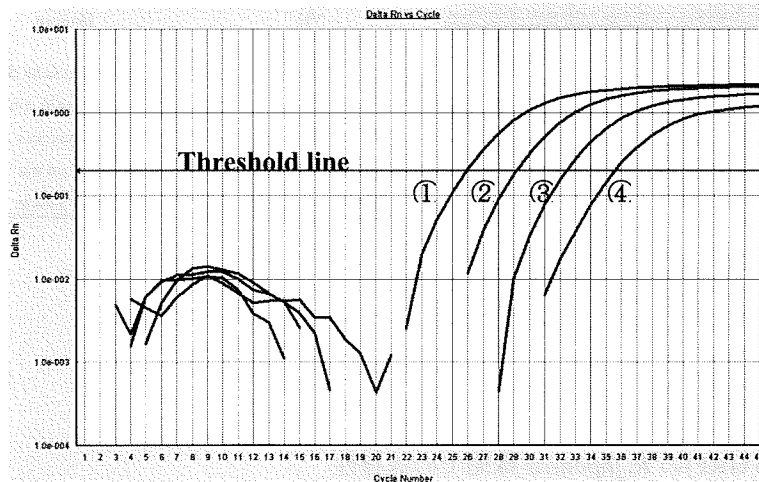


図 1 Real-time PCR 検出限界検定結果例

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 サイクル数を示す。Threshold line が示す蛍光強度で、サイクル数を求めた。① 1000 コピー、② 100 コピー、③ 10 コピー、④ 1 コピーの合成 DNA を使用した。

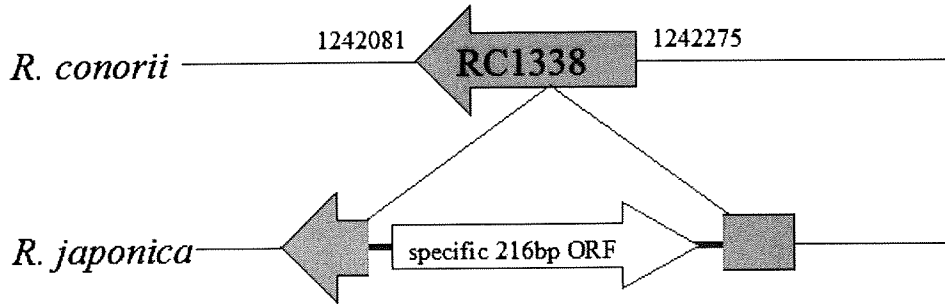
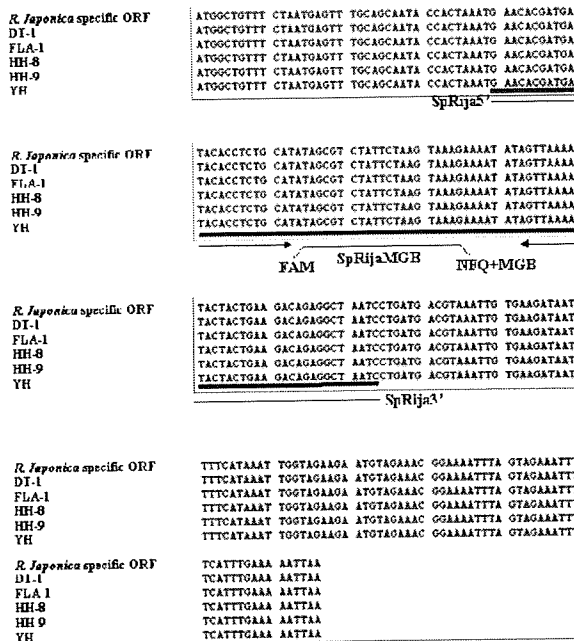


図2 *R. japonica* 特異的 DNA 配列マップ

R. conorii と *R. japonica* 特異的な配列領域をゲノムマップ比較した。

216bp ORF は *R. conorii* RC1338 ホモログ中に挿入された形で存在することが明らかとなった。



Strain	Isolation source
DT-1	<i>Dermacentor taiwanensis</i>
YH (ATCC VR-1363)	Human
FLA-1	<i>Haemaphysalis flava</i>
HH-8	<i>Haemaphysalis hystricis</i>
HH-9	<i>H. hystricis</i>
HH-12 (not shown)	<i>H. hystricis</i>
HH-13 (not shown)	<i>H. hystricis</i>

図3 Region-1(216 bp ORF)の *R. japonica* 株間での保存性

CletsalW を用いたアライメント図と、使用した菌株の由来、リアルタイム PCR 検出領域、プローブ及び配列の情報を示した。*R. japonica* 特異的 DNA 領域は、YH 株、DT-1 株、FLA-1 株、HH-8 株、HH9 株、HH-12 株 (not shown)、HH13 株 (not shown) 間で、100%配列が一致し完全に保存されている。

プライマー及びプローブ配列を含む黒太線の領域は GenBank に AB437281 として登録した。アライメントは BioEdit ver. 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)を用いて編集した。

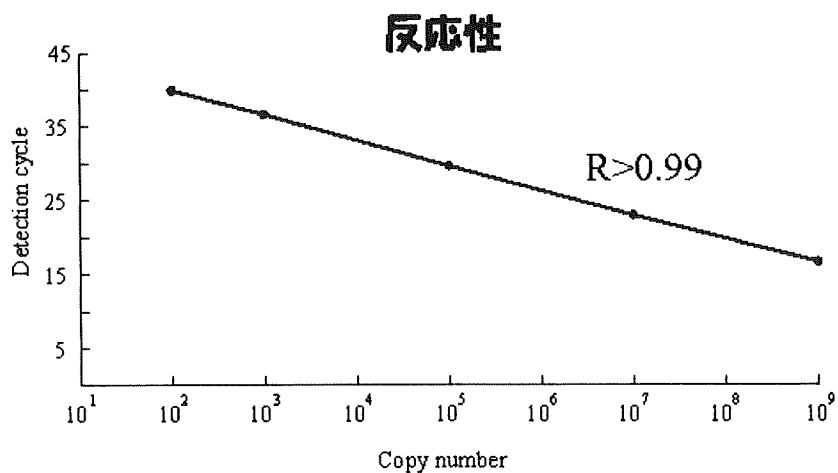


図4 *R. japonica* Real-time PCR の反応性及び感度比較

標準曲線によって反応性を確認した。 10^9 、 10^7 、 10^5 、 10^3 、 10^2 の検出部位を含む DNA 断片を用いた Real-time PCR 結果は $R > 0.99$ の反応性を示した。各データは 3 回行った実験データの平均値であり、各プロットには平均検出サイクル値 ± 標準偏差を示した。

9. 超高速病原体ゲノム解読システムの構築と 包括的な核酸迅速診断法の確立

研究分担者	黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	芹澤昌邦	(ヒューマンサイエンス振興財団 リサーチ・レジデント)
	関塚剛史	(国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター第三室 研究員)
	井上 智	(国立感染症研究所獣医科学部第二室)
	奥谷晶子	(国立感染症研究所獣医科学部第二室)
	野川泰寛	(東京都芝浦食肉衛生検査所)

研究要旨 未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されつつある。その危険性に対する確かな対処法を立案・整備する上で、使用された病原体を網羅的かつ迅速に配列解読することは最も確かなアプローチの一つと考える。次世代ゲノムシーケンサーが開発されたことで、数年を要した全ゲノム解読作業は数週間で終了することが可能となった。この全ゲノム解読技術を効率的かつ安定的に運用する体制を整えることで、WHO 指定バイオテロ病原体の配列データ及び変異情報のデータベースを充実させリファレンス情報を増やし、有事において迅速に対応出来る体制を整えることを本研究課題は目標としている。

本年度は、昨年度同定した炭疽菌 *Bacillus anthracis* コアゲノムに内在する計 2,965 loci の 1 塩基多型 (SNP) から 80 loci を tag-SNPs として選別し、簡易株系統分類法を開発した。炭疽菌・日本分離株を 12 株使用し、その分類法の有効性を確認したところ、系統分類解析で汎用されている MLVA 法 (Multiple Loci Variable number tandem repeat Analysis) よりも分解能が優れていることが分かった。この新規分類法は、環境常在菌であるセレウス菌 *Bacillus cereus* を含むセレウス・グループ全般の汚染検出の判別も可能であり、包括的でありながら簡易検査として機能する手法を確立した。また、炭疽菌の第一治療選択薬であるシプロフロキサシン耐性の中等度耐性に関与する薬剤排泄系の SNPs を同定し、その薬剤排泄機構を生化学的に解析した。

本年度の目標であった病原体感染モデルによる模擬演習を行った。病理所見で炭疽菌感染が陰性のマウス肝臓・脾臓サンプルであっても、網羅解読法により炭疽菌を検出することができた。この感染モデルによる模擬演習を通して、非常事態において十分機能し貢献できる「次世代シーケンサーによる病原体網羅検出システム」を構築した。

A. 研究目的

未知病原体や変異病原体による新興感染症の汎発流行、そしてそれらを利用したバイオテロなどの危険性は近年社会的不安の一つとして認識されている。最先端技術を駆使した次世代ゲノムシーケンサーにより、今までは数年を要した全ゲノム解読が数週間で終了することが可能となった。最先端の革新技術を応用し、効率的かつ安定的に病原体検査システムを運用する体制を整え、WHO 指定バイオテロ病原菌および未知病原体をも検査対象とする網羅的解析法を構築することを目的としている。

B. 研究方法

1) WHO 指定バイオテロ病原菌である炭疽菌の簡易

株系統分類法の開発

炭疽菌のような極めて配列保存性の高い菌種であっても、ゲノム及びプラスミドの配列の長さは株ごとに異なるため、単純に配列の比較を行うことは出来ない。そこで reference 配列を設定し、そこへ各菌株の分断した配列情報をマッピングすることで配列比較を行い、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を探索する方法を検討した。

次世代シーケンサーの解読配列 (イルミナ社の場合 36 塩基からなる数百万配列のデータ) を maq v0.7.1 (Mapping and Assembly with Qualities; <http://maq.sourceforge.net/index.html>) で Ames0581 株の reference 配列にマッピングし SNP の検出を行った。また公開されている既知の配列を 36 塩基ずつランダムに分断することで擬似的な次

世代シーケンサーの出力配列を作成し(疑似リードの作成)、そのデータを用いて同様の解析を行った。公共データベースで公開されている17株及び、昨年度全ゲノム解読を行った国内分離株2株(BA103, BA104)について、総当たり戦での配列比較を行い、SNPの網羅的探索及びデータベース作成を行った(図1)。

得られた全SNPsから80箇所のtag-SNPsに集約し、そのtagグループから、できうる限り*B. anthracis*に特異な配列を代表SNPとして選別した(図1)。加えて、既知炭疽菌病原因子(*cyaA*, *pagA*, *capA*, *capB*)を陽性コントロールに選び、また、セレウス菌毒素であるセレウリド合成遺伝子(*cesA*, *cesB*)をその他陽性コントロールとして選んだ(図2)。

計86カ所のPCR反応を行い、アガロースゲル電気泳動にてPCR産物を確認後、BigDye terminator v3.1にてシークエンス解読を行い、SNPsアレルを確定した。確定したアレルを連結後、NJ法(x1000 bootstrapping)にて系統樹を作製した。

2) 炭疽菌CPFX耐性に関する新規SNPの探索

日本分離株BA103, BA104から、キノロン剤のシプロフロキサシン(CPFX)を用いて人為的に薬剤耐性株を選別した。Etest法にて薬剤感受性試験を行った。前項の全ゲノム解読と同様に、薬剤感受性が低下した株(BA103-CIPr, BA104-CIPr)のゲノム配列を解読し、親株のゲノム配列と比較ゲノム解析を行ってSNPとindel(挿入・脱落)を特定した。

薬剤排泄阻害剤Reserpineを10 mg/LになるようMuller-Hinton寒天培地に予め添加し、Etest法にてCPFXに対する感受性の変化を検討した。

3) 病原体感染モデルを用いた病原体同定の模擬演習

動物用ワクチン株である炭疽菌Sterne株を感染させたマウスモデルを作製し(研究協力者:野川泰寛・東京都芝浦食肉衛生検査所)、炭疽菌接種2日後のホルマリン固定脾臓・肝臓サンプルを得た。HE染色、グラム染色等で検討した。ホルマリン固定組織からDNA, RNAを精製し、イルミナ網羅解読法にて病原体が検出されるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

1) WHO指定バイオテロ病原菌である炭疽菌の簡易株系統分類法の開発

標準株であるAmes 0581株をreference配列に設定し、網羅的なSNP探索を行った結果9,766箇所の

SNPを抽出することが出来た。そこからVNTR領域(Variable Number Tandem Repeat)などの次世代シーケンサーの弱点でデータの正確性が低くなる可能性が高い繰り返し多型の部分やマッピング結果の信憑性が低い領域を除外した結果2,798箇所のSNPに絞り込むことができた。同様に、炭疽菌のプラスミドpX01には99箇所、pX02には68箇所のSNPサイトを見出すことが出来た(図1)。

今回の解析に用いた炭疽菌19株それぞれに関し、計2,965箇所のSNPサイトの塩基情報を集積し系統分類解析を行った。全SNPsによる系統分類結果は、他の系統分類法として汎用されているMLVA法を用いた結果とほぼ一致していた(図2)。

次に2種類の塩基で構成されるbi-alleleのサイトに関して、Major allele(ゲノムの場合は全19株中10株以上でtypingされた側の塩基)とminor alleleの判別を行い、tag-SNPのグループ解析を行った。染色体では41グループ、pX01では22グループそしてpX02では17グループに分類されることがわかった。各グループに属するSNPサイトのうち任意の1箇所のSNPをそのグループを代表するtag-SNPを選定した。それら合計80のtag-SNPを用いたin silico PCRシミュレーションを行った結果を図3に示す。それら合計80のtag-SNPを用いることで、炭疽菌と他のセレウスグループ菌(*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*)との鑑別が可能であることが分かった。さらに、計12株の炭疽菌と12株のセレウスグループ菌を用いて80-tag SNPs PCRを行ったところ、図3のシミュレーションと同様に炭疽菌の鑑別に有用であることが分かった(図4)。このPCR産物を元にして配列解読を行い、特定したSNPアレルを用いた系統分類解析を行った結果、MLVA法を用いてのグループ分けの結果とほぼ一致した(図5)。

これら結果から、炭疽菌の種鑑別と並行して株系統分類にまで応用できる簡易株系統分類法を開発した。

2) 炭疽菌CPFX耐性に関する新規SNPの探索

DNA複製阻害に働くキノロン系薬剤の標的酵素はDNA gyrase(subunit A, *gyrA*; subunit B, *gyrB*)及びDNA topoisomerase IV(subunit A, *parC*; subunit B, *parE*)であり、様々な菌種のキノロン系薬剤耐性株においてそれら遺伝子上の変異が以前から報告されている。そこで、今回解析に用いたCPFX中等度耐性・炭疽菌2株(BA103-CIPr, BA104-CIPr)において、それら遺伝子上に新たな変異がないか調べた。その結果、CPFXに対する耐性が94倍に上昇しているBA104_CIPr株において*gyrA*遺伝子内に変異(G256C, Ala86Pro)を検出した(Table1)。この変異は保存性の高いQRDR(キノロン耐性決定領域)に含まれており、大腸菌において

該当する変異が報告されていることから、この Ala86Pro の非同義アミノ酸置換が BA104 のキノロン耐性化に関与しているものと考えられる。

CPF_X 中等度耐性を示す BA103-CIP_r では QRDR に塩基変異は認められず、薬剤排泄系を調節すると思われる転写抑制因子 GBAA0833 とその近傍に集中して塩基変異が認められた (Table 1, 2. 図 6 A)。qRT-PCR により近傍の薬剤排泄系の転写量を検討したところ、CPF_X 中等度耐性株で顕著な転写増強が認められた (図 6 B)。加えて、薬剤排泄阻害剤である Reserpine を添加した培地で薬剤感受性試験を行ったところ、CPF_X の感受性 breakpoint である 0.25 mg/L に近くまで感受性が増強していた (図 6 C)。これら結果から、変異導入によって GBAA0833 の転写調節機能が欠損し、薬剤排泄系の転写増強に伴う薬剤排泄で CPF_X 中等度耐性を獲得していると示唆された。

3) 病原体感染モデルを用いた病原体同定の模擬演習

炭疽菌を接種したマウスモデルを選んだが、ワクチン株という弱毒株のため、脾臓、肝臓において重篤な病態は見られず (図 7)、また、炭疽菌と思われるグラム陽性球菌を検出するために多くの組織標本をくまなく探す必要があった。

そこで、イルミナ網羅解読法にて炭疽菌を検出できようかどうか検討するため、ホルマリン固定組織から精製した DNA, RNA の 5 µg を始発材料として解析を行った。DNA サンプルから 7,768,642 リード、RNA サンプルから 11,994,089 リードの総解読数を得た (図 7)。得られたリード配列を blastn 相同性検索で病原体候補を検索したところ、RNA サンプルからのみ炭疽菌プラスミド pX02 配列と 100% の相同性を示す解読リードが検出された (図 8)。その相同性から、セレウス菌等の他セレウスグループ菌とは異なり、炭疽菌感染を疑う結果を得ることができた。炭疽菌特有の病原性因子 (pX01 由来の *pagA* と *cyaA*、pX02 由来の *capB*) を対象に qRT-PCR 法にて検証したところ、*capB* のみ増幅が認められた (図 9)。また、DNA を始発材料とするよりも、RNA を用いたほうが感度良く検出できることが分かった。

感染組織サンプルを分与頂いた当初、炭疽菌感染としか情報はなく、pX01 欠損の弱毒株であることを知らなかったのだが、イルミナ網羅解読および qRT-PCR 法にて、感染していた株特性をも説明できる配列情報を得た。

D. 考察

1) WHO 指定バイオテロ病原菌である炭疽菌の簡易株系統分類法の開発

従来、炭疽菌の検出には病原性因子 (*pagA*, *lef*, *cyaA*, *capABC*) の PCR 検査が用いられている。しか

しながら炭疽菌の病原性因子を保有する *B. cereus* G9241 株が報告されており、炭疽菌鑑別に加えて、炭疽菌様の病原性が付与されたセレウス菌の鑑別も必要とされるであろう。本研究で開発した簡易株系統分類法は、種鑑別と病原性因子の鑑別も同時に行うことができ、それと並行して SNP による株系統解析も行える。バイオテロ等の有事においては、検査漏れがなく且つ迅速に発生源を特定するための遺伝情報を取得することが重要であり、この簡易株系統分類法は有効に機能するものと考えられる。

2) 炭疽菌 CPF_X 耐性に関与する新規 SNP の探索

細菌のキノロン耐性で知られている QRDR に加え、CPF_X 耐性に関与する新規変異ホットスポットを同定した。転写因子の遺伝子欠損による薬剤排泄系の転写増強そして排泄亢進であるため、必須遺伝子領域の QRDR の塩基変異よりも変異導入効率が高いと想定される。この排泄系による中等度耐性は感受性 breakpoint の数倍程度であるが、QRDR 変異を伴う高度耐性化の布石として非常に重要な耐性化ステップと思われる。旧来の QRDR を対象とした検査のみでは、この中等度耐性株の存在を見逃してしまい、キノロン剤治療中に高度耐性化する可能性も考えられる。本研究により、感受性-高度耐性の間を埋める検査対象を同定した。従来の薬剤感受性試験とともに、より包括的な遺伝子検査法を提案する基盤情報を得た。

3) 病原体感染モデルを用いた病原体同定の模擬演習

バイオテロ等の有事において、病原体の分離培養とともに、患者検体から迅速且つ直接病原体を同定できるシステムが望ましい。PCR 等は既知病原体のみ対象とするため限定的である。本研究の網羅解読法は病原体の種類を問わないため、未知病原体も検査対象となりうる (配列の類似性による推定を含む)。感染動物による模擬演習で実際に検出・同定が可能かどうか検討した結果、病理所見に特徴の無いサンプルでも、網羅解読法にて炭疽菌を検出することができ、網羅的核酸診断法が十分に機能していることを証明できた。

今後、ヒト検体による実践的な解析事例を増やし、ウイルス・細菌・寄生虫の種類を問わない解析システムの構築を目指したい。

E. 結論

全ゲノム配列レベルの解析結果を基礎として、炭疽菌の包括的な遺伝子検査法を開発し、バイオテロ発生等の具体的な事例においても対応できる網羅核酸診断システムを構築した。今後、より広範な WHO 指定バイオテロ病原体にも解析を拡大し、網羅解析を有効に活用してより分離能の優れた株系統

検査法を開発する予定である。いつ何時、新型インフルエンザウイルス等の新興感染症、バイオテロが発生するのか予見できないため、生じうる非常事態を想定しながら網羅的核酸診断システムの更なる改善に努めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by the multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. J Vet Med Sci. 2010 Feb;72(1):93-7. Epub 2009 Nov 13.

2) 学会発表

1) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智。全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索。第92回日本細菌学会・関東支部会。東京 2009年11月

2) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智。全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索。第83回日本細菌学会総会。横浜 2010年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

Strategy of extraction for whole SNPs

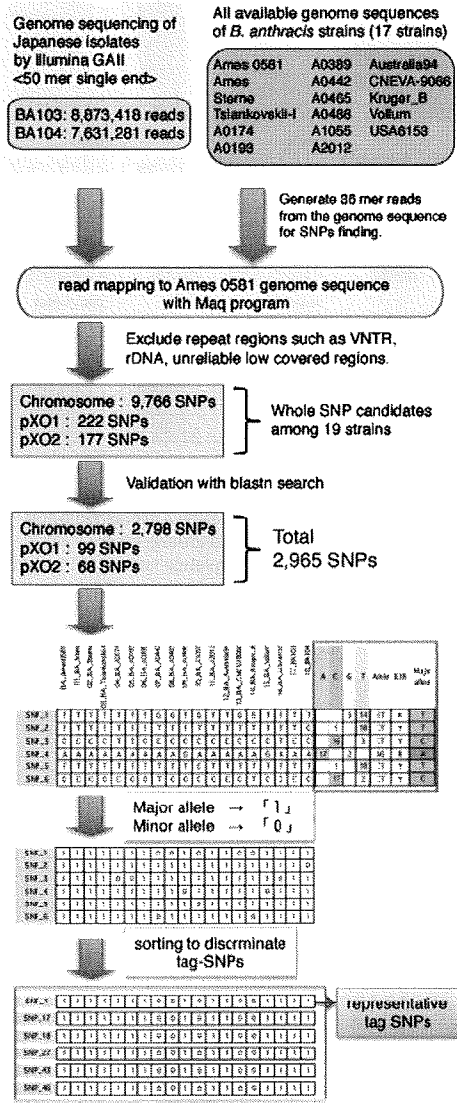


図1 炭疽菌ゲノム情報から全 SNPs および tag-SNPs の同定手順

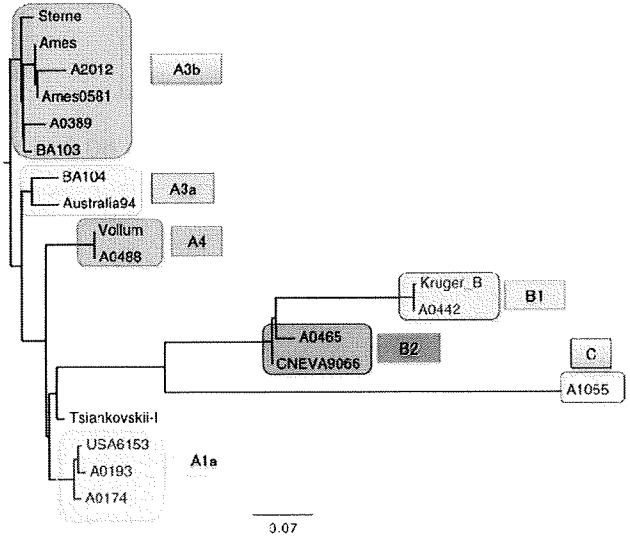


図2 全 SNPs (2,965 loci)における株系統樹。NJ法、x1000 bootstrapping.