

図3 80-tag SNPsのin silico PCRシミュレーション。80 lociと炭疽菌・セレウス菌毒素のポジティブコントロールを加え、計86-PCRプライマーを作製し、PCRシミュレーションを行った予想結果を示す。

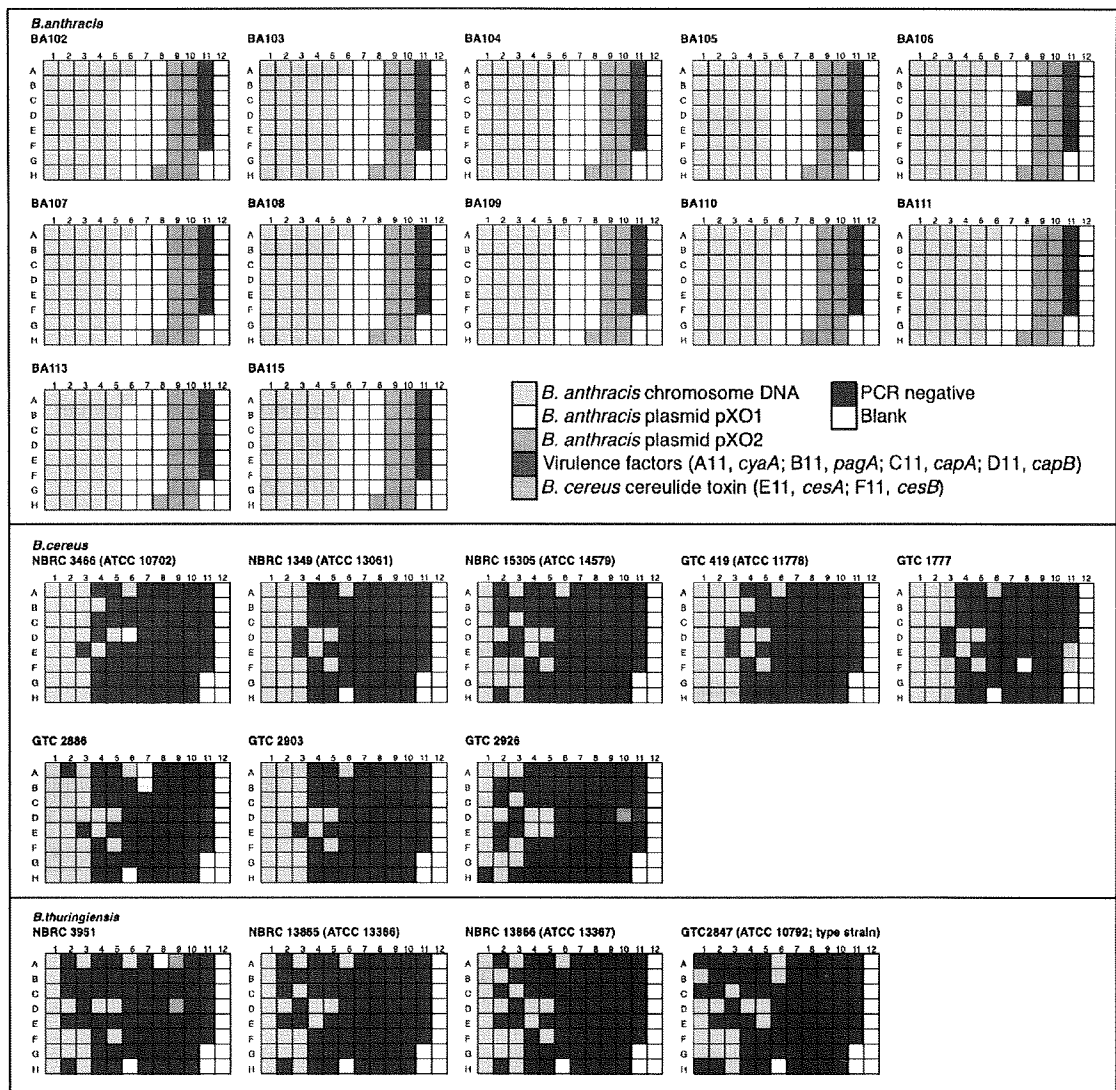


図4 80-tag SNPsのPCR検証。図3のPCRシミュレーションを分離株により検証した。炭疽菌とその他セレウスグループ菌との鑑別が十分可能であることが分かった。

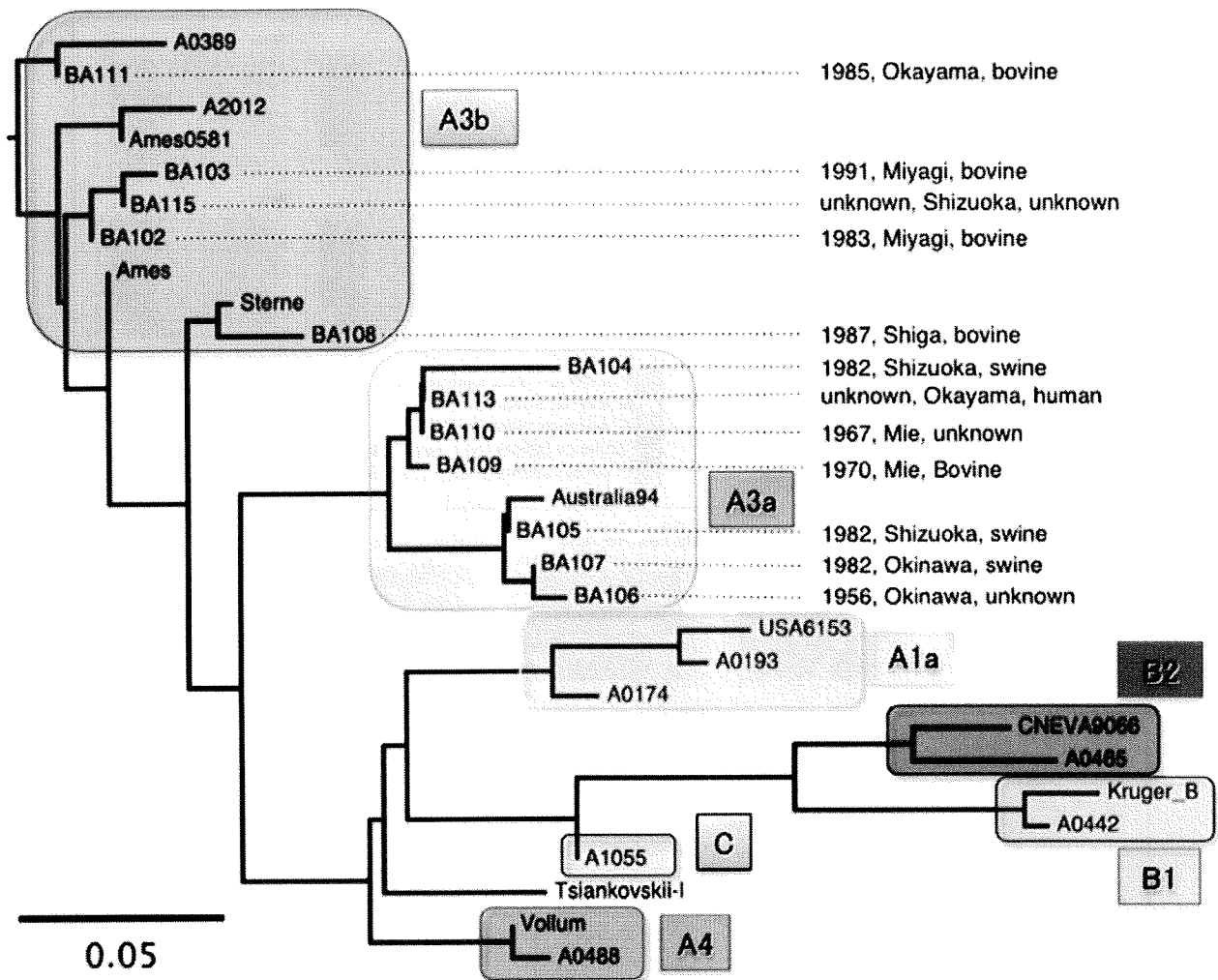


図5 80-tag SNPs の PCR 産物をシーケンス解析し、得られた SNP アレルから NJ 法 (x1000 bootstrapping) にて系統樹を作製。日本分離の使用菌株の分離年・場所・由来を系統樹と併記している。

TABLE 1. SNVs specific to the derivative CIP resistant mutants of BA103 and BA104.

	Genomic position ^a	Detected SNVs ^c			Type of DNA substitution	Amino acid substitution	Read depth ^e		Genetic information on the SNVs			
		Ames 0581	Parental strain ^d	Mutant strain ^d			Parental strain ^d	Mutant strain ^d	Locus tag ^f	Product	Strand ^g	
BA103 derivatives												
CIP MIC (mg/L) ^a	842,518	<u>ACT</u>	<u>ACT</u>	<u>ATT</u>	Transition	Thr38Ile	88	173	GBAA0834	TetR family transcriptional regulator	+	
· Parent : 0.064												
· Mutant : 1.5												
BA104 derivatives												
CIP MIC (mg/L) ^a	6,850	<u>GCT</u>	<u>GCT</u>	<u>CCT</u>	Transversion	Ala86Pro	170	183	GBAA0006 (<i>gyrA</i>)	DNA gyrase subunit II	+	
· Parent : 0.064	2,138,798	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	<u>GAA</u>	Transition	Lys80Glu	5	8	GBAA2291	Sensor histidine kinase	+	
· Mutant : 6	4,595,343	T	T	C	Transition	-	75	25	Intergenic region (GBAA5072 -- 5074)	-	-	

^a MIC of ciprofloxacin for parental strains and CIP resistant mutants of BA103 and BA104.

^b Numbers indicate the genomic position of the *B. anthracis* Ames 0581 strain. (GenBank Accession number, NC_007530)

^c Bold and underlined nucleotide indicates the SNV position.

^d "Mutant strain" indicates CIP resistant mutant generated from each "Parental strain" by *in vitro* selection in this study.

^e Read depth indicates the number of short-reads generated by the illumina genome analyzer II which mapped to each SNV position.

^f Locus tags were described as shown in the Comprehensive Microbial Resource (CMR) and Entrez Gene. As for the intergenic region, genes located adjacent to the SNV are shown.

^g Clockwise and counterclockwise gene direction are indicated "+" and "-", respectively.

TABLE 2. Indels specific to the derivative CIP resistant mutants of BA103 and BA104.

	Genomic position ^b		Detected indels			Genetic information on the Indels		
	Insertion	Deletion	Ames 0581	Parental strain ^c	Mutant strain ^c	Locus tag ^d	Product	Strand ^e
BA103 derivatives								
CIP MIC (mg/L) ^a	-	842,291 – 842,295	TAACA	TAACA	---	Intergenic region (GBAA0833 – 0834)	-	-
· Parent : 0.064								
· Mutant : 1.5	5,215,555 – 5,215,556	-	CA	CA	CACA	GBAA5724 (<i>yhcF</i>)	translation-associated	-
BA104 derivatives								
CIP MIC (mg/L) ^a	-	336,869 – 336,873	ACTTA	ACTTA	---	GBAA0328	SMR family multidrug efflux	+
· Parent : 0.064								
· Mutant : 6		842,291	T	T	-	Intergenic region (GBAA0833 – 0834)	-	-
	842,715	-	C	C	CC	GBAA0834	TetR family transcriptional	+
	1,059,593 – 1,059,594	-	GT	GT	GTGT	GBAA1077	hypothetical protein	-
	2,609,500 – 2,609,503	-	CGGC	CGGC	CGGCCGGC	GBAA2814	UvrD/Rep helicase family	-
	3,363,521 – 3,363,526	-	GTCACC	GTCACC	GTCACCGTCACC	GBAA3656 (<i>parC</i>)	DNA topoisomerase	-
	3,796,958 – 3,796,959	-	CT	CT	CTCT	GBAA4143 (<i>yjgF</i>)	ComK regulator	-
	-	4,286,011 – 4,286,021	TACCTTACAGT	TACCTTACAGT	-----	Intergenic region (GBAA4707 – 4709)	-	-
	4,831,099 – 4,831,104	-	GTCCCC	GTCCCC	GTCCCCGTCCCC	GBAA5329	iron compound ABC transporter	-

^a MIC of ciprofloxacin for parental strains and CIP resistant mutants of BA103 and BA104.

^b Numbers indicate the genomic position of the *B. anthracis* Ames 0581 strain. (GenBank Accession number, NC_007530)

^c "Mutant strain" indicates CIP resistant mutant generated from each "Parental strain" by *in vitro* selection in this study.

^d Locus tags were described as shown in the Comprehensive Microbial Resource (CMR) and Entrez Gene. As for the intergenic region, genes located adjacent to the SNP are shown.

^e Clockwise and counterclockwise gene direction are indicated "+" and "-", respectively.

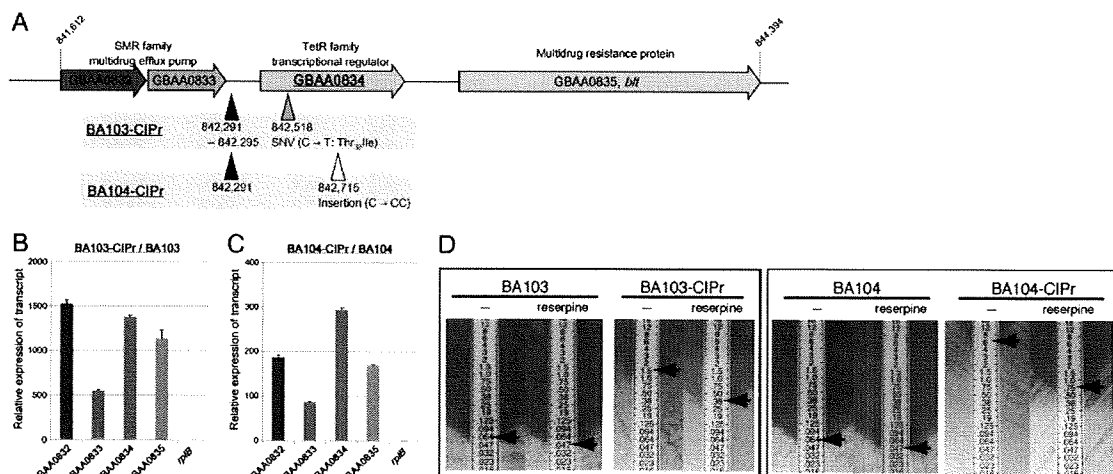


図6 CFX 中等度耐性に関与する薬剤排泄系。A) 転写抑制因子 GBAA0834 と近傍の薬剤排泄系の遺伝子構造と同一した SNP と indel。B,C) CFX 耐性株における薬剤排泄系の転写増強。D) 薬剤排泄阻害剤 reserpine による薬剤排泄阻害と CFX 感受性の増強。

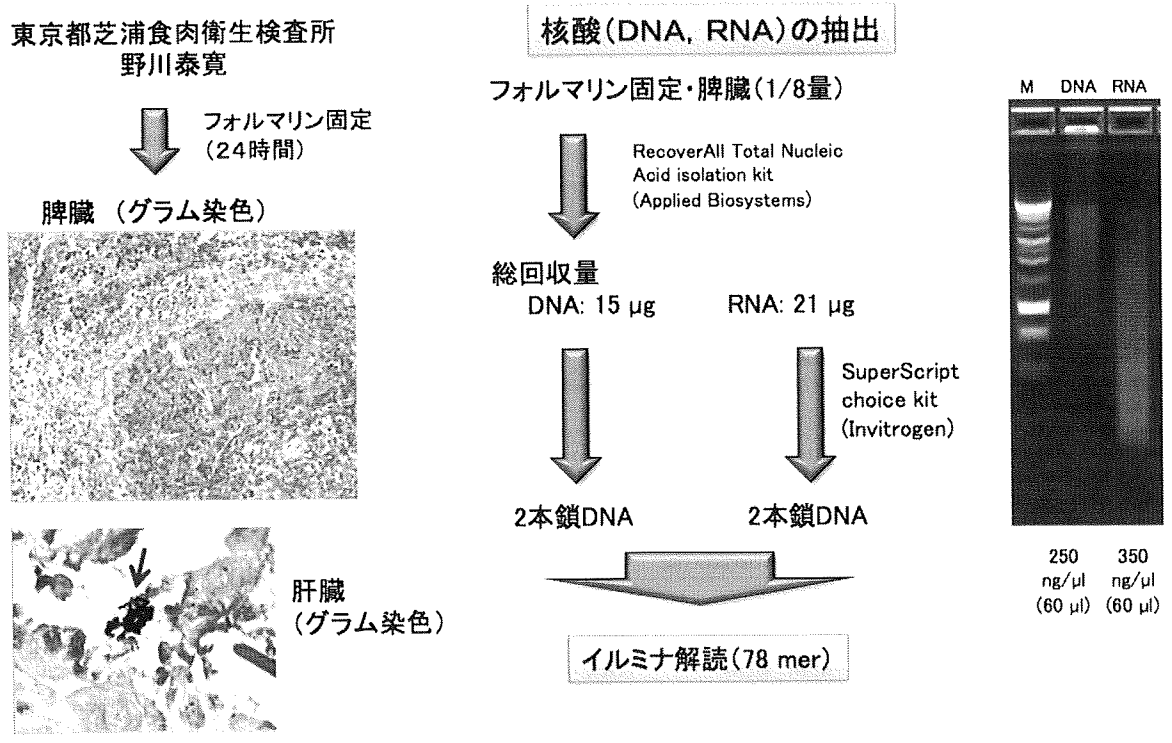


図7 マウス感染実験材料からの病原体検出・同定

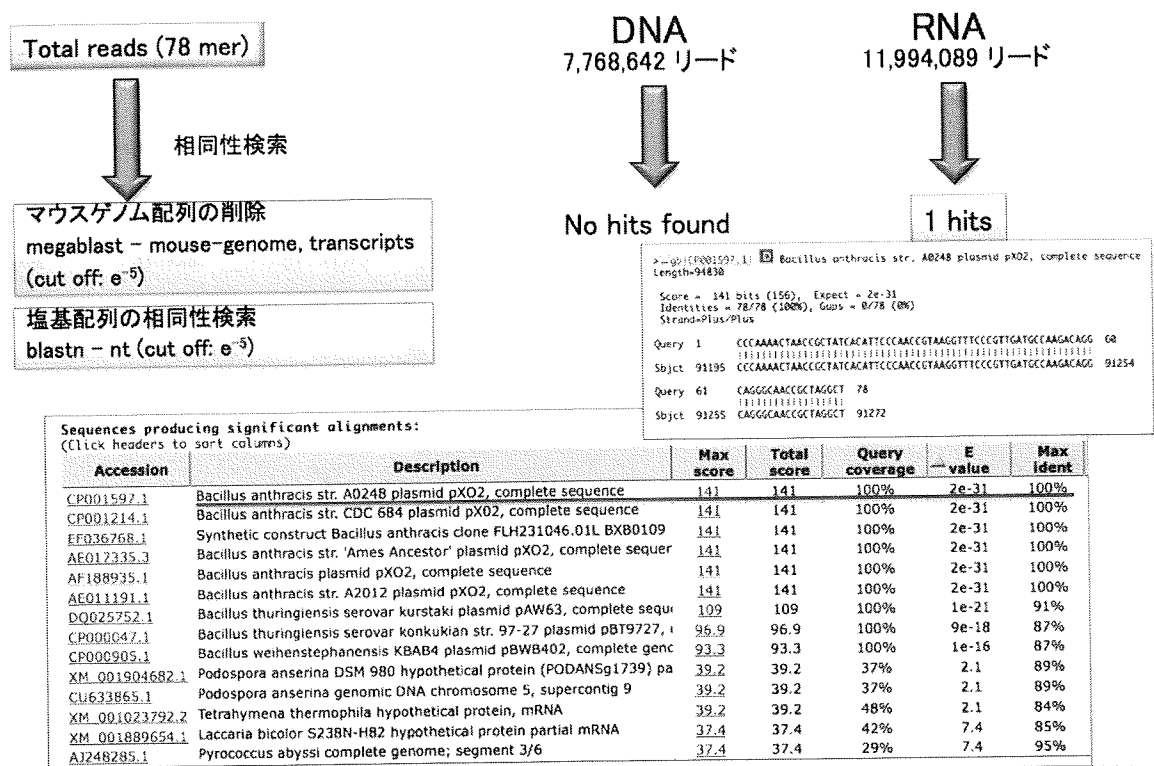


図8 イルミナ網羅解読リードからの炭疽菌由来配列の検出

定量的PCR、RT-PCRで検証

	pXO1		pXO2
	pagA/GAPDH	cyaA/GAPDH	capB/GAPDH
Spleen-DNA	-	-	-
Spleen-RNA	-	-	1.4E-07

- ↓
- 10⁷細胞に 1 菌体の割合
 - RNAを検査することで感度上昇

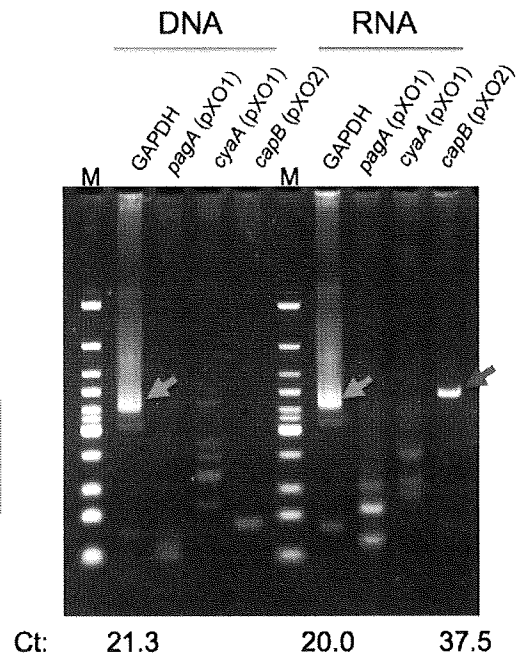


図9 定量的 RT-PCR による炭疽菌検出

10. 検体調整法およびスクリーニング法の普及、 バイオテロ検査マニュアルの作製と検査担当者の育成

研究分担者	田中智之	(堺市衛生研究所)
研究協力者	矢野公一	(札幌市衛生研究所)
	岡田峰幸	(千葉県衛生研究所)
	黒木俊郎	(神奈川県衛生研究所)
	倉田 毅	(富山県衛生研究所)
	山下育孝	(愛媛県立衛生環境研究所)
	吾郷昌信	(長崎県環境保健研究センター)
	吉田菊喜	(仙台市衛生研究所)
	皆川洋子	(愛知県衛生研究所)
	田中敏嗣	(神戸市環境保健研究所)
	片野晴隆	(感染研 感染病理部)
	三好龍也	(堺市衛生研究所)

研究要旨 バイオテロ対象特定病原体の検出法の普及と検査担当者の育成を目的とした「定量的 PCR 法を用いたオルソポックスウイルスの検出法」および「定量的 PCR 法を用いたバイオテロ特定病原体(ウイルス)の網羅的スクリーニング検査検出キット」の評価を行った。評価機関は全国 10 地衛研である。その結果、期待された病原体遺伝子の検出は可能であった。しかし、様々な検討課題およびキット等の改良課題が浮上し、今後の精度高いキットの改良、全国地衛研への普及に向けた重要な課題が提案された。さらに、バイオテロ特定病原細菌についての検出キットの構築・評価、検査マニュアル作製が次年度の課題として残された。

A. 研究目的

2001 年 9 月、米国での同時多発テロを契機に、炭疽菌芽胞によるバイオテロが発生し、本邦でもいわゆる「白い粉事件」の多数の模倣事件が発生した。

昨年の本班研究分担では白い粉事件の詳細な調査を行い、その結果から、検査対応機関の大部分は地方衛生研究所(地衛研)であることが判明した。このことは広域的バイオテロ発生時には地衛研のスクリーニング検査体制が極めて重要で、技術的専門性をもった迅速な対応が常備されなければならないことも判明した。しかし、バイオテロ対象特定病原体は炭疽菌だけではない。CDC のカテゴリー A の病原体のみならずカテゴリー B さらには将来的に脅威となる病原体も対象と考えられる。

そこで、今年度はバイオテロ対象のウイルスに焦点を合わせて研究分担者にて作成された「定量的 PCR 法を用いたオルソポックスウイルスの検出法」および「定量的 PCR 法を用いたバイオテロ特定病原体(ウイルス)の網羅的スクリーニング検査検出キット」について、バイオテロ危機発生時での対応すなわちキットの操作性、迅速性、精度、特異性等におけるプロトコールに従った実践的な評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 材料

感染研で開発された 2 つのキット、「定量的 PCR 法を用いたオルソポックスウイルスの検出法」(国立感染症研究所ウイルス I 部 森川)

及び「定量的 PCR 法を用いたバイオテロ特定病原体(ウイルス)の網羅的スクリーニング検査検出キット」(感染病理部 片野)のプロトコール、調整リアルタイム RT-PCR 用試薬および評価対象となる検出特定病原体 cDNA を用いた。

2) 方法

各ブロックにおける本班の研究協力者に加えて、大都市での対応を含めて、100 万都市の3地衛研の協力を得て全国10地衛研によって、上記2キットの評価を行った。10地衛研にはプロトコールと共に各キットの必要試薬、下記の検査概要に加えてプロトコール等を送付した(参考資料1,3)。また、操作終了後にアンケートによる全体的な意見集約を行った(参考資料2)。

【定量的 PCR 法を用いたオルソポックスウイルスの検出法】

概要

生物テロに使用される可能性のある天然痘を含むオルソポックスウイルス遺伝子を簡易・迅速に検出することを目的としたキット

特徴

- ・ SYBR Green Assay による定量的なオルソポックスウイルス遺伝子共通検出法 (2種類)
- ・ 天然痘ウイルスを含むオルソポックスウイルス特異的な遺伝子検出が可能 (バリデート済み)

- ・ 2種類とも数~10 コピーの検出感度

- ・ プライマー混和液-A3L(200 μ L)注1)
- ・ プライマー混和液-H2R(200 μ L)注2)
- ・ Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 Master Mix (Roche) (650 μ L)
- ・ 陽性コントロール核酸1(ワクチニアウイルス DNA 断片)
- ・ 陰性コントロール核酸1 (単純ヘルペス I 型ウイルス DNA 断片)
- ・ Standard DNA A3L用 107 コピー/ μ L (60 μ L)
- ・ Standard DNA H2R用 107 コピー/ μ L (60

μ L)

- ・ プロトコール

【定量的 PCR 法を用いたウイルスの網羅的検出法】

概要: 生物テロに使用される可能性のあるウイルスの核酸を簡易・迅速に検出することを目的としたキット

特徴: ・ FAM-および HEX-標識プローブにより一つのウェルで2種類のウイルスを検出。

- ・ 3時間で27種類のウイルスの検出が可能。
- ・ Multiplex one step-real time RT PCR により DNA ウイルスも RNA ウイルスも同時検出可能。
- ・ 2x プローブ・プライマー混和液(80 μ l 24種類,各1本)
- ・ 2x QuantiTect Master Mix (Qiagen) (1ml x2本)
- ・ QuantiTect RT mix(Qiagen) 45 μ l
- ・ 陽性コントロール核酸1(サル痘ウイルス DNA 断片, 10 μ l)
- ・ 陽性コントロール核酸2(西部馬脳炎ウイルス cDNA 断片,10 μ l)
- ・ 陽性コントロール核酸3(新型インフルエンザウイルス cDNA 断片,10 μ l)
- ・ プロトコール

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

1) 定量的 PCR 法を用いたオルソポックス

スウイルスの検出法

(1) 平均作業時間

試薬調整から装置開始 0.65 時間

PCR 反応 1.82 時間

データの解析 0.74 時間

合計作業時間 3.21 時間

(2) 実験実施者について

役職は室長補佐、部長、科長、副部長、係長、主任研究員、研究員、技術職員などで平均年齢は約43歳。ウイルス検査経験は平均12年、リアルタイム PCR の経験年数は

平均 4.5 年であり、ウイルス検査の実働職員であることが推定された。

(3) 検出結果

- ・全て特異的に検出 3 施設
- ・非特異反応が出た 1 施設
- ・反応が得られないものがあった 3 施設
- ・その他

全て特異反応が検出できなかった (2 施設)
検量線・コントロール共に増幅されず

A3L では 7 乗だけ、H2R でも 3 乗までしか検出出来なかった (1 施設)

- ・その他の応用
アデノウイルス、天然痘ワクチン株

LO-IV は検出されたが糞便中からのノロウイルス RNA 抽出液では検出されなかった。

(4) プロトコールの活用性については、

- 分かりやすい 3 施設
- 何とか対応 5 施設
- 分かりにくい 0 施設

(5) その他の意見を原文のまま列記

・送付された試薬量が 1 回の分量しかなくて、疑問点のある箇所においても再検討不可能であった。

・最初に Master Mix と混合するプライマー混和液の量が A3L 用 24 μ l と H2R 用 22 μ l となっているが正しいのでしょうか？

・A3L 用のスタンダード 10³ コピー以下が増幅しなかった。

・ABI 7500 Fast Real-Time PCR System では記載の反応条件でランできなかった。

・PCR 産物の電気泳動では、ほぼ単一バンドのシグナルが得られていることから、PCR 反応条件には問題は無いと思われる。

・H2R 用の standard を B2→B8 に、濃い→薄いの順に入れてしまった。ボルテックスは、well 間のコンタミの危険があるので行わなかった (試薬調整→プレート遠心→装置にセット、の順序で行った)

・個人的には SYBR での経験がほとんどなかったため、セットアップと、結果の処理でとまどった。

・Standard の Well 数が多いので今のマスターミックスの量だと 2run しかできません。もう少し量を多く提供していただくことは、可能でしょうか。

また、作業上の問題点として、

・ABI 7500Fast では PCR の extension で 10sec の設定ができずに、最短の 25sec で反応を行った。

・反応条件が ABI7500 では設定できない。

・standard の希釈がうまく行かなかった

・反応サイクルの条件で、0 秒の設定が出来なかったため、1 秒として実施した。FAST タイプの機器がなく、FAST 対応のプレートを使用出来なかった。

・ABI 7500 Fast と ABI 7900HT の 2 機種を用いて測定を行った。ABI 7500 Fast については、反応条件 72 $^{\circ}$ C 10sec を設定できないため 72 $^{\circ}$ C 25sec で実施した。95 $^{\circ}$ C 0sec も設定できないので 95 $^{\circ}$ C 1sec にて実施した。

さらに、プロトコール改良点として、

・A3L 用と H2R 用、各々 Detector を設定する必要があることを明記してほしい

・Fast タイプの試薬を使用しているプロトコールであるが、当所では現在 FAST タイプの機器はなくプレート、チューブについては通常のリアルタイム用をもちいたが、問題はないのか？

・リアルタイム PCR 装置によっては、95 $^{\circ}$ C 0sec など設定できない反応条件があるので、装置毎の反応条件等を記載したほうが、わかりやすいと思います。また、陽性コントロールのおおよそのコピー数も記載しておけば、検出結果の検証に役立つと思います。

・反応条件以外のプロトコールは分かりやすい。

・操作や反応プレートの図などを示して、視覚的にわかりやすく説明したほうがよい。

2) 定量的 PCR 法を用いたウイルスの網羅的検出法

(1) 平均作業時間

試薬調整から装置開始	0.6 時間
PCR 反応	2.1 時間
データの解析	0.7 時間
合計作業時間	3.4 時間

(2) 実験実施者について

役職は部長、科長、副部長、係長、主任研究員、研究員、技術職員などで平均年齢は約 47 歳。ウイルス検査経験は平均 9.7 年、リアルタイム PCR の経験年数は平均 4.1 年であり、ウイルス検査の実働職員であることが推定された。

(3) 検出結果

(a) 陽性コントロール（3 種類）の検出状況

全てで陽性	4 施設
2 つで陽性	5 施設
西部馬脳炎ウイルスのみ	1 施設
全く検出されなかった施設	0 施設

(b) 新型インフルエンザウイルス陽性検体の検査結果

6 施設で手持ちの新型インフルエンザ陽性検体を検査し、いずれも陽性の結果を得た。陽性コントロール 3 が陰性の結果を得た 6 施設でも 5 施設で新型インフルエンザ陽性検体が陽性になることを確認している。

(c) その他検査結果

インフルエンザウイルス A 型、インフルエンザウイルス H5N1、天然痘ワクチンが各 1 施設で検討され、いずれも該当ウイルスが特異的に検出されていた。

(4) プロトコールについて

1. 分かりやすかった。5 施設
2. 分かりにくい点があったがなんとかできた。5 施設
3. 分かりにくく、参考にならなかった。0 施設

(5) その他の意見

- ・ HEX の NTC で非特異反応が出た。
- ・ 8 連チューブで試薬を送付するのはコンタミネーションの原因になるのでやめた方がよい。
- ・ NTC の試薬は、スタンダードと別のチューブで送付するほうが良いと思う。
- ・ 操作や反応プレートの図などを示して、

視覚的にわかりやすく説明したほうがよい。

・ 送付された試薬量が 1 回の分量しかなくて、疑問点のある箇所においても再検討不可能であった。

・ 結果の判定・解釈

（内因性コントロールの Well はどうなるのが正しい？

・ インフルエンザ A は新型インフルエンザ H1 や鳥インフルエンザにも反応する？、低濃度のスタンダードが検出しない場合）について説明が欲しい。

・ NTC、スタンダードにも検体を加えることになるが、NTC の中身は何か。

・ 8 連チューブのレイアウトも考慮してほしい。96 ウェルプレートは余り使う機会がないので。

・ 同一 well で FAM と VIC の両方で検出するのに、各々 Detector を設定する必要があることを明記してほしい。

・ 添付の陽性コントロールでは、内因性のコントロールが検出できない点を記載する必要がある。

・ 陽性コントロールのおおよそのコピー数を記載すべき。

D. 考 察

バイオテロ対象特定病原体を迅速かつ網羅的に検出するスクリーニングキットの開発およびその評価を行った。これらのスクリーニングキットは国立感染症研究所が考案・作成されたものであり、それらの検出系、迅速性、操作性について地衛研が評価した。キット評価に参画していただいた地衛研の検査担当者は、リアルタイム PCR 検査歴 4 年以上のベテラン達であり、キットの操作性については 100% の信頼度を抱いてもよいと判断する。

以下 2 つのキットの評価について考察する。

1) 「定量的 PCR 法を用いたオルソボックスウイルスの検出法」について

本検出キットは、オルソボックスウイルスの H2R 遺伝子と A3L 遺伝子を検出対象とした「SYBR Green Assay による定量的なオ

ルソポックスウイルス共通遺伝子検出系」であり、天然痘ウイルスを含むオルソポックスウイルス特異的な遺伝子検出が可能(表 1)である。Roche のライトサイクラーを用いた場合に、2種類とも数~10 コピーの検出感度で遺伝子が検出できる。また、反応後の denature による melting curve 解析からウイルス種が予測できる場合がある(図 1)。なお、本キットは Roche の LightCycler 用に開発されたキットで他機種と同様な機器での使用にあたっては、充分バリデートされていなかったため、予想した結果が得られない場合があった。今後、使用機器毎に推奨される試薬キットと反応条件を再評価したい。

2) 「定量的 PCR 法を用いたウイルスの網羅的検出法」について

陽性コントロール 1, 2 はどの施設でも安定して検出されており、システムそのものは全ての施設で稼働したと考えている。ある程度結果がばらついたのは施設毎に使用機器が異なっていたことが大きく、機器毎に条件検討を行なう必要があると考えられた。HEX (VIC) の NTC における非特異シグナルはほぼ全ての施設で観察されており、送付前の分注の際に起こったコンタミネーションが原因と推察される。本キットは Taqman real time PCR を応用した比較的複雑な実験系であったためか、アンケートではプロトコル上の疑問やシステムそのものに関する質問が多かった。プロトコルは事前に数施設で検討し、改良したものであったが、スタンダードの内容などについて説明が不足していた点があり、機種に合わせたプロトコルの作成など、さらなる改良が必要である。今後、核酸抽出法の検討やプロトコルの改良など検討すべき点はあるものの、生物テロに使用される可能性のあるウイルスを幅広くスクリーニングする簡易キットとして使用可能であると考ええる。

2 つのキットの評価を総括すると、

1. システムそのものは全ての施設で稼働したと考えられる。

2. 結果がばらつきは施設毎に使用機器が異なっていたことが大きく、機器毎に条件検討を行なう必要があると考えられる。
3. 試薬の送付前の分注の際にはコンタミネーション防止に心掛ける。
4. 今後は入念なプロトコルの事前検討を行なうことが重要である。
5. スタンダードの内容などについての説明不足を解消する。
6. 機種に合わせたプロトコルの作成、改良が必要である。
7. これらの改良を踏まえて、今後、生物テロに使用される可能性のあるウイルスを幅広くスクリーニングする簡易キットとして使用可能であると考ええる。

この中で浮上した大きな課題は、別表(参考資料 4) に示すように、各地検では様々な機器が使用され統一されていない点である。今回の結果はそれによると考えられる検出系の格差が見られた。最大公約数の使用機器を対象としたプロトコル、検出系等の再構築が必要である。

これらの課題を改良することにより、より精度の高い検出系が構築されるものと思われる。また、今回の評価や課題をもとに、「バイオテロ検査マニュアル」作製に前進できるものと思われる。

今年度は、10 地衛研での評価であったが、来年度には全国地衛研を対象にキット評価をして頂く予定である。しかし、特に上記の課題は重く普遍的な評価に繋がらない可能性が高い。地衛研のブロック代表者の参加可能性を調査し、ブロック単位で連携の下に評価を行わなければならない事態が発生するかもしれない。

また、このバイオテロ特定病原体スクリーニング検査キットの構築は、ウイルスだけに限らず、病原細菌についても遂行していかなければならない事業である。この研究班の大きな使命であり、予告なしに且つ広域に発生するバイオテロ対策にはこの班で構築された検査キットなくしては対応できない。

E. 結 論

「定量的PCR法を用いたオルソポックスウイルスの検出法」および「定量的PCR法を用いたバイオテロ特定病原体(ウイルス)の網羅的スクリーニング検査検出キット」の評価を、全国10地衛研で行った。総合的には、期待された病原体遺伝子の検出が可能であった。しかし、色々な検討課題、検査の改良課題が浮上し、今後の精度高いキットの改良に重要な評価結果であった。今後、バイオテロ特定病原細菌についての検出キットの構築・評価、検査マニュアル作製が次年度の課題として残された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- (1) 藤井史敏、前野敏也、藤本卓司、内野清子、三好龍也、松尾光子、吉田永祥、田中智之
新型インフルエンザ感染が証明された激症型溶血性レンサ球菌感染症の一例, IDWR, 通巻第11巻第48号, 22-23, 2009
- (2) 内野清子、高橋幸三、三好龍也、松尾光子、狩山雅代、吉田永祥、田中智之、石井まどか、岡村隆行、藤井史敏、前野敏也
2009/10シーズン、新型インフルエンザウイルス遺伝子と同時に検出されたB型インフルエンザウイルス, IDWR, 通巻第12巻第1号, 16-18, 2010
- (3) 田中敏嗣、新型インフルエンザ検査チーム、神戸市における新型インフルエンザ検査の対応について、臨床とウイルス, 38(1), 99-105, 2010

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考資料 1 (ボックスウイルス検出キット説明書)

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発とその評価法の確立に関わる研究」班 国立感染症研究所ウイルス1部 森川茂、感染病理部 佐多徹太郎 2009.11.2

生物テロ対策用ボックスウイルス検出リアルタイム PCR キット 説明文書

送付キット内容

1. プライマー混和液-A3L (200 μL)注1)
2. プライマー混和液-H2R (200 μL)注2)
3. Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 Master Mix (Roche) (650μL)
4. 陽性コントロール核酸 1 (ワクチニアウイルス DNA 断片)
5. 陰性コントロール核酸 1 (単純ヘルペス I 型ウイルス DNA 断片)
6. Standard DNA A3L 用 10⁷コピー/μL (60 μL)
7. Standard DNA H2R 用 10⁷コピー/μL (60 μL)
8. プロトコール

注 1) プライマー混和液-A3L は、ボックスウイルス DNA の A3L 遺伝子を標的として設計したプライマーセット。

注 2) プライマー混和液-H2R は、ボックスウイルス DNA の H2R 遺伝子を標的として設計したプライマーセット。

試薬 1-7 は到着後-20℃にて保存下さい。

検査目的と内容

- 本 PCR キットは生物テロに使用される可能性のあるオルソボックスウイルス属ウイルスの核酸 (DNA) を簡易・迅速に検出することを目的としたキットです。
- 今回配布いたしました目的は本キットを多くの施設に頒布するに当たり、事前に使用上ならびにキット自体の問題点を明らかにし、テロ対策における実用性の検討を行う点にあります。本手順書に従って作業を行い、キットの評価をお願いいたします。
- なお、サンプルからの核酸抽出法は各施設で異なるため貴施設で行われている方法をご採用いただき、今回の共同研究ではキットなど方法の統一は行いません。

バイオリスク管理上の参考事項・注意事項

1. 本キットに含まれる陽性コントロールはウイルス DNA で、ウイルスではなく感染性はありませんが、クローニングは固く禁じます。
2. 本キットのすべての試薬にはウイルスや DNA 組換え実験の対象になるプラスミドは含まれません。
3. プライマーの配列は原則非公開としております。ご了承下さい。
4. 本キットはスクリーニング検査キットであり、陽性検体は個々のウイルスを対象とする検査を行った上で最終判定を行います。したがって、本キットの結果は最終判定とは異なる場合があります(擬陽性の可能性)。

- 試薬は 5 反応分 (5 検体分) が含まれています。また本キットには、オルソボックスウイルス DNA を検出するためのプライマー混和液が A3L と H2R の 2 種類用意されています (送付キット内容 1. と 2. を参照)。各プライマー混和液に対し、対応する Standard DNA をご使用ください (送付キット内容 6. と 7. を参照)。陽性コントロール及び陰性コントロールが 1 本ずつ添付してあります。コントロールを用いた系の動作確認後、お手持ちの核酸をお試しください。
- このキットでは 96 穴プレートの各ウェルで下記の表 1 のように試薬を加えます。A1-8、B1-8 には検量線を描くための試薬が、また、A9-10、B9-10 では内因性のコントロールが検出できるようになっています。

表 1

Well	A3L 用	Well	H2R 用
A1	NTC	B1	NTC
A2	Standard 10 (A3L)	B2	Standard 10 (H2R)
A3	Standard 10 ² (A3L)	B3	Standard 10 ² (H2R)
A4	Standard 10 ³ (A3L)	B4	Standard 10 ³ (H2R)
A5	Standard 10 ⁴ (A3L)	B5	Standard 10 ⁴ (H2R)
A6	Standard 10 ⁵ (A3L)	B6	Standard 10 ⁵ (H2R)
A7	Standard 10 ⁶ (A3L)	B7	Standard 10 ⁶ (H2R)
A8	Standard 10 ⁷ (A3L)	B8	Standard 10 ⁷ (H2R)
A9	陽性コントロール 1	B9	陽性コントロール 1
A10	陰性コントロール 1	B10	陰性コントロール 1
A11	Unknown sample	B11	Unknown sample

作業時間の目安

1 検体につき、試薬調整から装置のスタートまでが 0.5 時間、PCR 反応時間が 2 時間、データの解析等に 0.5 時間、合計 3 時間程度が見込まれます。キットには 5 検体分の試薬が含まれ、複数検体を 1 プレート上で行うことも可能です。

必要な機械、試薬等

リアルタイム PCR 装置 (ABI 7900HT) 試薬は Roche 社の LightCycler 用ですが、ABI 7900HT での反応を確認済みです。

96 ウェルプレート:各装置に合った、普段お使いのプレートをお使い下さい。プレートシール (またはキャップ) も必要です。

滅菌 1.5 ml チューブ、フィルターチップ

プロトコール

1. 試薬類を室温にて融解します。
2. PCR 装置を起動します。

3. まず A3L 用に 156 μ l の Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 Master Mix を滅菌 1.5ml チューブに移し、プライマー混和液-A3L を 22 μ L 加えます。H2R 用にも同じ容量の Master Mix に、プライマー混和液-H2R を 22 μ L 加えます。
4. 96 ウェルプレート上の A1-A11 のウェルに 3 で作製した A3L 用の試薬を 15 μ L ずつ分注します。同様に、B1-B11 のウェルにも 3 で作製した H2R 用の試薬を分注します。
5. ポックスウイルス検出 PCR システム-A3L および H2R 用に、各 Standard DNA を 10^7 コピー/ μ L から 10 倍ずつ段階希釈をします。Standard DNA 10^7 コピー/ μ L を 5 μ L、蒸留水を 20 μ L 加えて 5 倍希釈します。(2 $\times 10^6$ コピー/ μ L の溶液が作製できます。) 希釈した溶液を 5 μ L、蒸留水を 45 μ L 加えて 10 倍希釈し、以降、10 倍ずつの段階希釈を行い、A3L および H2R について、Standard DNA 2×10^6 から 2 コピー/ μ L の溶液を作製します。反応には、各 Standard DNA を 5 μ L ずつ使用するので、 10^7 から 10 コピー/ μ L の DNA 溶液を検出することになります。
6. A1-B11 のウェルに、表 1 で設定されているように、5 μ L の検体、5 で作製した Standard DNA、および陽性コントロール、陰性コントロールを加えます。
7. プレートをシール (またはキャップ) し、10 秒間ボルテックスした後に spin down します。
8. プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、下記の設定、反応条件で Real time PCR を行います。(ソフトウェアの使用法については各装置の責任者にご確認ください)

設定： 96 well plate を選択、各ウェルで Reporter を SYBR に、Quencher を Non Fluorescent に設定します。Standard curve, NTC (non template control) は上記の表 1 のように設定します。各ウェルで Task を選択し、Unknown、Standard、NTC を選択します。Standard を選択したウェルでは、Quantity に初期濃度 (10^7 コピーから 10 コピーまで) を入力します。Sample volume は 20 μ l とします。

反応条件： 95 $^{\circ}$ C, 60sec \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 15sec, 63 $^{\circ}$ C 5sec, 72 $^{\circ}$ C 10sec) \times 45 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 0sec, 73 $^{\circ}$ C 15sec, 95 $^{\circ}$ C 0sec \rightarrow 40 $^{\circ}$ C 30sec

データの解析と保存

反応終了後、Standard curve が描出できていることを確認します。Standard curve において 100 コピー以上で陽性になり、NTC が増幅されていないことを確認します。必要があれば cycle threshold を変更します。さらにウェルごとの定量結果が表示されますので、100 コピー以上を陽性とします。データを Export して、Excel ファイルとして保存します。

結果の報告

以下の 2 種類のファイルを下記送付先までお送り下さい。

1. SDS から export したエクセルファイル: ファイル名をサンプル名として保存し、回数分のファイルをお送り下さい。Sheet に貼り付けて一つのファイルにしてお送りいただいてもかまいません。
2. アンケート: ワードファイルのアンケートにお答えい

ただき、添付ファイルとしてお送り下さい。

結果及びアンケートの送付先

国立感染症研究所ウイルス 1 部第 1 室 森川茂
E-mail: morikawa@nih.go.jp

締め切り

2009 年 11 月 27 日正午

お問い合わせ先

技術的なお問い合わせ：
国立感染症研究所ウイルス 1 部第 1 室 森川茂
Tel: 042-561-0771 内線 3320 Fax: 042-565-3315,
E-mail: morikawa@nih.go.jp

本研究およびバイオテロ班全体に関するお問い合わせ：

堺市衛生研究所 田中智之
Tel: 072-238-1848 Fax: 072-227-9991
E-mail: tanaka-tom@city.sakai.lg.jp

国立感染症研究所感染病理部 佐多徹太郎

Tel: 03-5285-1111 内線 2602 Fax: 03-5285-1189,
E-mail: tsata@nih.go.jp

参考資料 2

生物テロ対策用ボックスウイルス検出リアルタイム PCR キット アンケート

回答者

施設名 : _____
所属 : _____
職名 : _____
氏名 : _____
住所 : _____
電話 : _____
Fax : _____
Email : _____

作業者について

所属 : _____
職名 : _____
年齢 : 20 代、30 代、40 代、50 代、60 代
ウイルス検査の経験年数 _____ 年
リアルタイム PCR の経験年数 _____ 年
普段使っているリアルタイム PCR の機種

作業について

1 検体当たりの平均作業時間
試薬調整から装置のスタートまで _____ 時間
PCR 反応 _____ 時間
データの解析等 _____ 時間
合計平均作業時間 _____ 時間

使用機種 : _____

作業上の問題点 :

結果について

配布されたコントロールは

1. すべて特異的に検出された。
2. 非特異反応が出た。(具体的に記載して下さい。)
3. 反応が得られなかったものがあった。
4. その他 (_____)

配布されたコントロール以外のサンプルについて

1. やって見た
下記にサンプル名と結果を記載して下さい。

2. やっていない。

プロトコールについて

理解しやすさ

1. 分かりやすかった。
2. 分かりにくい点があったがなんとかできた。
3. 分かりにくく、参考にならなかった。

プロトコールについて改善すべき点を下記にご記載下さい。

その他お気づきの点がございましたら下記にご記入下さい。

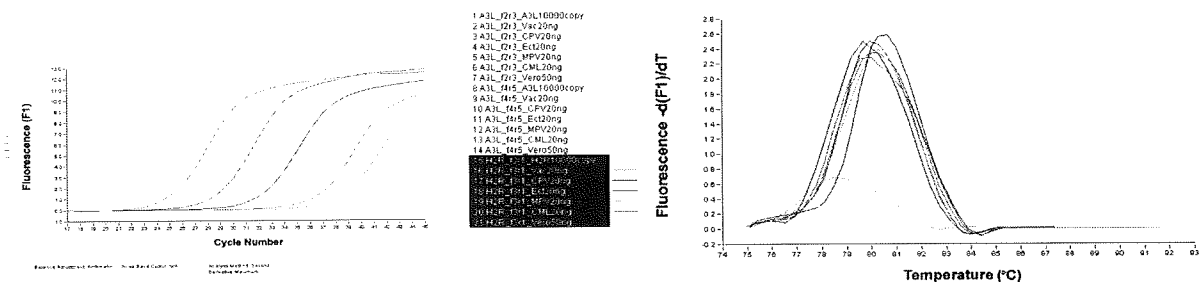
ご協力ありがとうございました。

表 1 本検出キットで遺伝子検出を確認したポックスウイルス

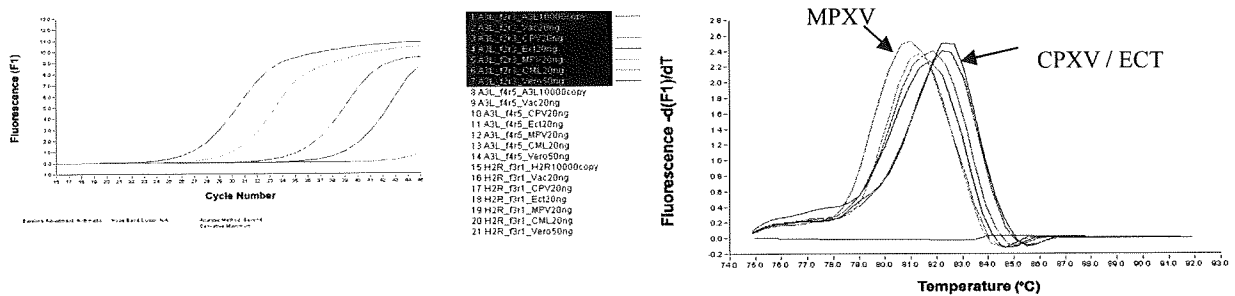
ウイルス	株
天然痘	India 1964
	Bangladesh 1975
	Sumatra 1970
	Nepal 1973
Monkeypox	Zr-599
Vaccinia	Lister
	WR
	IHDW
Cowpox	Brighton Red
Camelpox	J1
Ectromelia	Hamstead

HSV-1は検出されない

図 1 . SYBR Green Assay による定量的なオルソポックスウイルス共通遺伝子検出系



H2R-SYBR Green



A3L-SYBR Green

参考資料 3

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発とその評価法の確立に関わる研究」班 国立感染症研究所 感染病理部 片野晴隆・佐多徹太郎

2009.10.29

生物テロ対策用ウイルス検出リアルタイム PCR キット 説明文書

送付キット内容

- 9. 2x プローブ・プライマー混和液 (80 μl x 24 種類, 各 1 本)
- 10. 2x QuantiTect Master Mix (Qiagen) (1ml x 2 本)
- 11. QuantiTect RT mix (Qiagen) 45 μl
- 12. 陽性コントロール核酸 1 (サル痘ウイルス DNA 断片, 10 μl)
- 13. 陽性コントロール核酸 2 (西部馬脳炎ウイルス cDNA 断片, 10 μl)
- 14. 陽性コントロール核酸 3 (新型インフルエンザウイルス cDNA 断片, 10 μl)
- 15. プロトコール

1-6 は到着後 -20°C にて保存して下さい。

バイオセーフティー上の参考事項・注意事項

- 1. 本キットに含まれる陽性コントロールは 100bp 以下の DNA 断片 (PCR 産物) であり、感染性はありません。
- 2. プローブ、プライマーの配列は原則非公開としております。ご了承下さい。
- 3. 本キットはスクリーニング検査系であり、陽性検体は個別のウイルス検査を行った上で最終診断を行います。したがって、本キットの結果は最終診断とは異なる場合があります。

検査目的と内容

- 本 PCR キットは生物テロに使用される可能性のあるウイルスの核酸 (DNA, RNA) を簡易・迅速に検出することを目的としたキットです。感染症法で規定される第 1 種から第 3 種病原体のうちウイルスに分類される病原体およびヘルペスやインフルエンザなど鑑別診断に有用なウイルスを広くスクリーニングできるように設計されています。(ニパウイルス、ヘンドラウイルスは除いています。)
- 今回の研究の目的はこのキットをさまざまな施設に頒布する前に、キットの問題点やテロ対策の中でこのキットをどのように使用できるかの検討を行うことにあります。本手順書に従って作業を行い、評価をお願いいたします。
- 今回の研究では核酸抽出法の比較、検討は行いません。それぞれの施設で行われている方法で核酸抽出をお願いします。(陽性コントロールは抽出済み核酸です。)
- 試薬は約 8 反応分 (8 検体分) が含まれています。陽性コントロールが 3 本添付してあります。まずはこの 3 検体について実験して下さい。これらのコントロールがうまくいけば、手持ちの他の核酸 (インフルエンザウイルスなど) をお試しいただければと思います。

- このキットでは 96 穴プレートの各 well で下記のようなウイルスを検出します。また、A1-A9 には定量線を描くための試薬が、また、A10, B1 では内因性のコントロールが検出できるような試薬があらかじめ含まれています。

(表 1. チューブ番号と検出対象ウイルス)

Well	Tube No.	FAM	Hex (VIC, JOE)
A1	1	NTC	NTC
A2	2	Standard 10	Standard 10 ⁷
A3	3	Standard 10 ²	Standard 10 ⁶
A4	4	Standard 10 ³	Standard 10 ⁵
A5	5	Standard 10 ⁴	Standard 10 ⁴
A6	6	Standard 10 ⁵	Standard 10 ³
A7	7	Standard 10 ⁶	Standard 10 ²
A8	8	Standard 10 ⁷	Standard 10
A9	9	Beta-actin (control)	hGAPDH-DNA (control)
A10	10	単純ヘルペスウイルス 1 型	水痘帯状疱疹ウイルス
A11	11	サル痘ウイルス	天然痘ウイルス (1)
A12	12	B ウイルス	天然痘ウイルス (2)
B1	13	hGAPDH-RNA (control)	Beta-2-microglobulin (control)
B2	14	マールブルグ	エボラウイルス
B3	15	腎症候性出血熱ウイルス ハンターン	クリミアコンゴ出血熱ウイルス
B4	16	腎症候性出血熱ウイルス プーマラ	腎症候性出血熱ウイルス ドブラバ
B5	17	リフトバレーウイルス	腎症候性出血熱ウイルス ソウル
B6	18	ラッサウイルス	ハンタウイルス肺症候群ウイルス (Sin Nombre)
B7	19	南米出血熱ウイルス ガナリト	南米出血熱ウイルス フニン
B8	20	南米出血熱ウイルス サビア	南米出血熱ウイルス マチュポ
B9	21	東部馬脳炎ウイルス	ベネズエラ馬脳炎ウイルス
B10	22	狂犬病ウイルス	西部馬脳炎ウイルス
B11	23	インフルエンザ A	SARS コロナウイルス
B12	24	新型インフルエンザウイルス H1N1	高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1

作業時間の目安

1 検体につき、試薬調整から装置のスタートまでが 0.5 時間、PCR 反応時間が 2 時間、データの解析等に 0.5 時間、合計 3 時間程度が見込まれます。複数検体 (4 検体まで) を 1 plate 上で行うことも可能です。

必要な機械、試薬等

リアルタイム PCR 装置 (ABI 7500, ABI 7900, ABI 7700, Stratagene Mx3005P など。Taqman PCR に対応した装置)
 96 ウェルプレート:各装置に合った、普段お使いのプレートをお使い下さい。プレートシール (またはキャップ) も必要です。
 滅菌 1.5 ml チューブ, フィルターチップ: 普段お使いのものをお使い下さい。

プロトコール (1 回に 1 検体の場合)

9. 試薬類を室温に置き、融解します。
10. PCR 装置を立ち上げます。
11. 以下のように検体の調整をします。
 - (1) 添付の陽性コントロール核酸を試す場合

陽性コントロール核酸	1 μ l
滅菌水	9 μ l
合計	10 μ l
 - (2) 臨床検体等その他の検体を用いる場合

検体から核酸抽出キットなどで抽出した DNA または RNA の 10 μ l をそのまま使用します。量が少ない場合は滅菌水で 10 μ l に調整します。濃度は 100 ng/ μ l が目安ですが、キット等で抽出した液をそのままお使いになってかまいません。
12. 250 μ l の 2x QuantiTect Multiplex RT-PCR を滅菌 1.5ml チューブに移し、上記検体 (10 μ l) および 5 μ l の QuantiTect RT mix を加えて、混和します。
13. 上記の液を 96 ウェルプレート上の A1-B12 のウェルに 10 μ l/ウェルで分注します。
14. 2x プローブ・プライマー混和液を前ページの表 1 で指定されたウェルに 10 μ l/ウェルで添加します。
15. プレートにシール (またはキャップ) し、10 秒間ボルテックスした後に spin down します。
16. プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、下記の設定、反応条件で Real time PCR を行います。(ソフトウェアの使用法については各装置を普段使用している方にお聞き下さい。)

設定: 96 well plate を選択、各ウェルで Hex(reporter=HEX or VIC or JOE, quencher=BHQ1 or no fluorescent)/FAM (reporter=FAM, quencher=TAMRA) の multiplex とし、Rox を passive reference に設定する。Sample volume は 20 μ l。Standard curve, NTC (non template control) は以下のように設定する。

Well	FAM	Hex (VIC, JOE)
A1	NTC	NTC
A2	Standard 10	Standard 10 ⁷
A3	Standard 10 ²	Standard 10 ⁶
A4	Standard 10 ³	Standard 10 ⁵
A5	Standard 10 ⁴	Standard 10 ⁴
A6	Standard 10 ⁵	Standard 10 ³
A7	Standard 10 ⁶	Standard 10 ²
A8	Standard 10 ⁷	Standard 10
他	Unknown sample	Unknown sample

反応条件: 50° C, 30min → 95° C, 15min → (94° C, 15s → 60° C, 60s) × 40

データの解析と保存

反応終了後、Standard curve が描出できていることを確認します。Standard curve が 10 コピー以上で陽性になり、NTC が増幅されていないことを確認します。必要があれば reporter ごとに cycle threshold を変更します。定量結果は well/reporter ごとに示されます。各ウェルに示されたウイルス量は 10 コピー以上を陽性とします。データを Export して、Excel ファイルとして保存します。

結果の報告

以下の 2 種類のファイルを下記送付先までお送り下さい。
 1. SDS (ABI の装置) または MxPro (Stratagene の装置) から export したエクセルファイル: ファイル名をサンプル名として保存し、回数分のファイルをお送り下さい。また、下記のように欄外にサンプル名を記載して下さい。Sheet に貼り付けて一つのファイルにしてお送りいただいてもかまいません。

(表 2. エクセルファイルの例)

Well	Dye	Well Type	Threshold (dRn)	Ct (dRn)	Quantity (copies)	RSq (dRn)	Slope (dRn)
A1	HEX	NTC	0.0689	No Ct	No Ct	0.989	-2.588
A1	FAM	NTC	0.0881	No Ct	No Ct	0.998	-3.171
A2	HEX	Standard	0.0689	24.83	1.00E+07	0.989	-2.588
A2	FAM	Standard	0.0881	38.33	1.00E+01	0.998	-3.171
A3	HEX	Standard	0.0689	28.31	1.00E+06	0.989	-2.588
(中略)							
B9	HEX	Unknown	0.0689	No Ct	No Ct	0.989	-2.588
B9	FAM	Unknown	0.0881	No Ct	No Ct	0.998	-3.171
B10	HEX	Unknown	0.0689	No Ct	No Ct	0.989	-2.588
B10	FAM	Unknown	0.0881	No Ct	No Ct	0.998	-3.171
B11	HEX	Unknown	0.0689	No Ct	No Ct	0.989	-2.588
B11	FAM	Unknown	0.0881	No Ct	No Ct	0.998	-3.171
B12	HEX	Unknown	0.0689	No Ct	No Ct	0.989	-2.588
B12	FAM	Unknown	0.0881	No Ct	No Ct	0.998	-3.171

Sample: 陽性コントロール1

2. アンケート: ワードファイルのアンケートにお答えいただき、添付ファイルとしてお送り下さい。

結果及びアンケートの送付先

国立感染症研究所感染病理部 片野晴隆
 E-mail: katano@nih.go.jp

締め切り

2009 年 11 月 27 日正午

お問い合わせ先

技術的なお問い合わせ:
 国立感染症研究所感染病理部 片野晴隆
 Tel: 03-5285-1111 内線 2627 Fax: 03-5285-1189,
 E-mail: katano@nih.go.jp

本研究およびバイオテロ班全体に関するお問い合わせ:

堺市衛生研究所 田中智之
 Tel: 072-238-1848 Fax: 072-227-9991
 E-mail: tanaka-tom@city.sakai.lg.jp

国立感染症研究所感染病理部 佐多徹太郎
 Tel: 03-5285-1111 内線 2602 Fax: 03-5285-1189,
 E-mail: tsata@nih.go.jp

機器整備状況

(74地方衛生研究所回答 2009.8)

ABI		Roche	Bio-RAD	Takara	Cepheid
7000	11	480 2	iCycler IQ 1	Smart cycler II 2	Smart cycler II 1
7300	6	480-II 1			
7500	24	400 2			
7500Fast	17	330 3			
7700	2	2.0 2			
7900	12	1.5 2			
7900HT	25				
Step One Plus	13				
Total	110	12	1	2	1

1 1. バイオテロ関連疾患の臨床診断支援方法の開発 - バイオテロ関連感染症の臨床診断と治療 -

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症研究分野

研究協力者 古谷信彦 (文京学院大学保健医療技術学部・臨床検査学科)
河野 茂 (長崎大学院医歯薬学総合研究科・感染分子病態学)
谷口清洲 (国立感染症研究所・感染症情報センター)
宮崎義継 (国立感染症研究所・生物活性物質部)
國島広之 (東北大学医学部附属病院・検査部)
加來浩器 (東北大学院医学系研究科・感染制御・検査診断学)
藤井 毅 (東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・感染性分野)

研究要旨 生物テロに関連する疾患として特に重要と考えられる疾患について、インターネット上で手軽に情報を得ることを目的とした『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』のホームページを作成し、ICD を対象に実施したアンケート結果を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。今年度は、改訂専用のホームページを立ち上げ、全国の感染症専門家によって組織された研究協力者からの意見を参考して、内容の訂正や追加を実施した。

A. 研究目的

生物テロに用いられる可能性のある病原微生物は多彩で、その多くは極めて稀でかつ重篤な疾病を引き起こす。すなわち、感染拡大防止と生命予後改善のためには、生物テロ関連疾患の臨床診断、検査材料および検査方法の選択、治療法の選択について、多くの医療従事者が正確な知識を、インターネットなどを通じて手軽に得られることが大切である。本研究においては、最新のデータに基づいた、インターネット上で広く利用できる臨床診断および治療マニュアルの作成をおこない、専門家の意見を取り入れながら修正とアップデートをおこなってきた。今年度は、バイオテロ対応ホームページを通じて、より利用者のニーズに応えられるよう、一昨年実施した国内のインフェクションコントロールドクター (ICD) を対象としたアンケート調査の結果に加えて、新たに立ち上げた改訂専用のホームページを通じて、全国の感染症専門家によって組織された研究協力者から寄せられた意見を参考して、内容の訂正や追加を実施した。

B. 研究方法

『生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアル』の改訂専用のホームページを立ち上げ、感染症専門家の意見を参考して、改訂作業をおこなった。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

研究協力者から寄せられた意見を参考して、すでに作成していた、ウイルス性出血熱、ウエストナイル熱・脳炎、Q熱、狂犬病、コクシジオイデス症、SARS、消化管感染症、多剤耐性結核、炭疽、天然痘、鼻疽・類鼻疽、ブルセラ症、ペスト、ボツリヌス症、野兎病の各項目について細かな修正をおこなうとともに、最新の情報を追加して、ホームページのアップデートをおこなった。

また、前述の15項目のみではバイオテロに利用される可能性のある病原微生物を十分に