

## 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）  
倉園久生（国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部）

研究協力者 江崎孝行（国立大学法人岐阜大学・医学部）  
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とともに、細菌によるバイオテロ（炭疽菌、鼻疽菌、類鼻疽菌、ペスト菌、コクシエラ菌、オウム病病原体、レジオネラ）のスクリーニング用に、病原体と類縁菌のプライマー31種類をいれ、凍結乾燥したPCR Plateを送付して4か所で同一試薬セットを利用して評価を行い、同一のReal time PCR機器を保有する4機関で取得したデータを比較し、今後の対応を検討した。

### 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」による多数の摸倣事件が起り、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 of 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、画像がまだまだ少なく、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菌以外にペスト、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。

今年度は、本研究班では、炭疽の抗体価を測定する方法の野外検証試験、細菌性毒素の検出系のキット化への取り組み、そして危険病原細菌のPCR法による検出キットの作成と現場（地方衛生研究所）における検証のためのシステムづくり、について報告する。

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。炭疽の自然発生を減少する最良の対策は、動物における適正なワクチンプログラムと接種を行い、動物における炭疽の制御が効果的である。しかし、動物における炭疽菌に対する高い抗体価の有無を調べる系が無いと、炭疽の動物における発生を効果的に制御することができない。そこで、炭疽菌の防御抗原を用いた検査法を確立し、今回、野外での実証試験を行った。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、Stxsとコレラ毒素 (CT) とLT (カテゴリーB: Enteric Pathogens) 及び黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens) 等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的として行った。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるので種々の検査キットが市販されているものもある。本研究では上記の毒素に加えてウエルシュ菌エンテロトキシンやセレウス菌エンテロトキシン等に対する免疫学的迅速同定法を構築して、食品を用いたバイオテロに対する網羅的迅速同定法を国産で供給できるようにする。

Stxs に対する免疫学的迅速同定法 (Immunochromatography: IC) を構築して市販化した。CTおよびLTの精製を行ない、家兎を免疫するのに充分量の精製毒素を作成した。A型Btxの重鎖とSEAとSEBの発現に成功した。

細菌によるバイオテロのスクリーニング用

プライマー（炭疽菌、鼻疽菌、類鼻疽菌、ペスト菌、コクシエラ菌、オウム病病原体、レジオネラ）を一つの標的に対して3-4種類のprimerを搭載した乾燥PCR plateを供給し、将来の緊急時のスクリーニングに配布するための課題を抽出する基礎資料とすることを目的とした。

また、危険病原細菌によるバイオテロのスクリーニング用プライマー（炭疽菌、鼻疽菌、類鼻疽菌、ペスト菌、コクシエラ菌、オウム病病原体、レジオネラ）を一つの標的に対して3-4種類のprimerを搭載した乾燥PCR plateを供給し、将来の緊急時のスクリーニングに配布するための課題を抽出する基礎資料とすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 炭疽菌に関する研究

炭疽菌のpXO1<sup>+</sup>菌株であるSterne株のDNAを鋳型として、PCRによってPAドメイン3, 4の配列を含む領域を増幅させた。用いたプライマーは上流が

5'-ATTCATATGACTGCACGTATCATTTTAAT-3'

下流が

5'-AGAGGATCCTCTATCTCCATAGCCTTT-3'

である。なお、下線部の塩基配列は制限酵素Nde I と BamH I のそれぞれの認識部位である。PCR条件は、①94℃, 2分間を1回、②95℃, 30秒間、③60℃, 30秒間、④72℃, 30秒間で、②-④を1セットとして35回、⑤72℃で7分間を1回とした。



次に、PCR産物をTOPO TA cloning vector system (Invitrogen)を用いて、pCR 2.1-TOPOにTAクローニングした(pCR 2.1-TOPO ::PA)後、*Escherichia coli* TOP10株で形質転換した。Blue-White selectionを行い、選択された陽性クローンをLB培地にて37℃で一晩培養し、プラスミドをQIA plasmid miniprep (QIAGEN)を用いて抽出した。インサートの塩基配列をM13 ForwardおよびReverseプライマーを用いて、ABI PRISMS 310 Genetic Analyzer (CA, USA)によって解析し、変異が入っていないことを確認した。pCR 2.1-TOPO ::PAをNde I およびBamH I で消化してインサートを回収後、インサートとpET15bベクター (Novagen, Darmstadt, Germany)とのライゲーションを行った(pET15b::PA)。その後、DH5a株に導入し、形質転換を行った。形質転換体よりプラスミドを抽出し、制限酵素による消化パターンによって目的のインサートが挿入されていることを確認した。最後に、pET15b::PAを*E. coli* BL21 (IDH3) に導入し、目的の株を構築した(BL21 (IDH3) / pET15b::PA)。

BL21 (IDH3) / pET15b::PA は100 mg/mlアンピシリン加2×yeast-triptone (YT) 培地に懸濁し、37℃、200 rpmで一晩振盪培養した。その培養液少量を新たな2×YT 4 mlに加えた。その後、600 nmでの吸光度(OD600)が0.6~0.8になるまで37℃で振盪培養し、続いて、イソプロピル-b-D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度が0.1 mMから1 mMとなるように添加し、37℃で2時間培養した。各IPTG濃度の培養菌液1.5 mlを回収し、培養菌液を8,000 rpmで10分間遠心した。ペレットを100 mlの溶解バッファー(30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% sucrose, pH 8)に懸濁して、氷上で15分間静置後、13,000 rpmで10分間遠心した。ペレットは穏やかに氷冷5 M MgSO<sub>4</sub> 100 ml中で懸濁し、氷上で10分間静置後、同様に遠心した。上清をペリプラズム画分のサンプルとして回収した。得られたペレットを50 mlの透析用バッファー(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7.8)で懸濁後、氷上で超音波処理し、その後、13,000 rpmで10分間遠心した。上清を細胞質画分のサンプルとして回収した。得られたペレットを50 mlの変性バッファー

(8 M Urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8)に懸濁し、室温で1時間静置した。その後、13,000 rpmで10分間遠心した。上清を封入体画分のサンプルとして回収した。

CBB染色はBio-Safe™ Coomassie (BIO-RAD, Hercules, CA)を使用し、室温で1時間染色後、蒸留水(double distilled water : DDW)で一晩脱色した。

rPAは封入体よりNi-NTAアガロース(QIAGEN)を用い、付属のプロトコールに従って、尿素を用いた変性条件にて精製した。

IPTGの添加による大腸菌BL21株でのrPAの発現誘導のための条件検討を行った。2×YT培地で吸光度(OD<sub>600</sub>)が0.6~0.8になるまで培養した培養液に終濃度1 mMになるようIPTGを加え、37°Cで2, 4または6時間培養した。誘導後、菌を回収し、SDS-PAGEで解析した。全ての誘導時間で、IPTG依存的にrPAに相当する28.5 kDaのバンドがみられた。2時間の誘導よりも4時間の方が発現量が多く、また、6時間の誘導では4時間の誘導と同程度の発現しか得られなかった。したがって、以降の検討では、IPTG 1 mMで、37°Cで4時間の発現誘導条件でrPAを調製することとした。

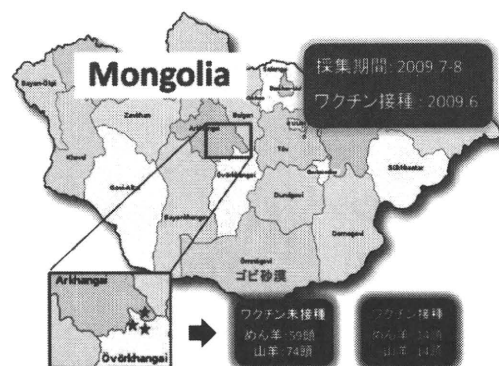
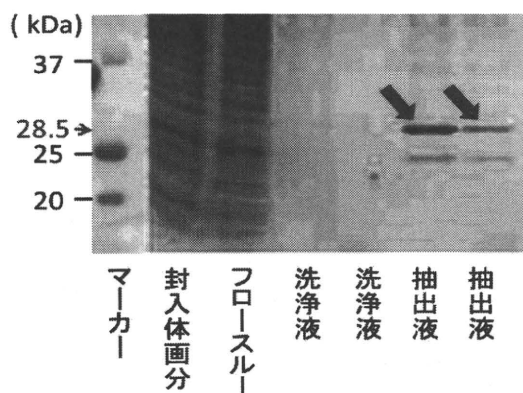
rPAを発現した大腸菌をペリプラズム画分、細胞質画分、封入体画分に分離した。rPAがどの画分にあるか調べるため、12.5%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、CBB染色および抗PA抗体を用いたウェスタンブロットを行った。rPAは封入体画分に多く含まれていた。したがって、封入体画分からNi-NTAアガロースを用いてrPAを精製した。抽出液中

に28.5 kDaのrPAの存在を確認した。この抽出液を用いて、抗PA抗体価測定ELISAを構築した。

血清の採集は2009年7-8月に、モンゴル獣医学研究所の協力を得て、Arkhangai県Khashaat、Uvurkhangai県Kharhorin, Hujirtの3ヶ所で行った。遊牧を営む農家の所有するめん羊と山羊から血液を採集した。採集時に、家畜の年齢とワクチン接種歴について確認した。また、ワクチン接種後の抗体価の変化を調べるために、炭疽非流行地であるDundgovi県Tsagaandelgerで飼育されているめん羊と山羊各2頭に荚膜欠損性弱毒変異株Sterne 34F<sub>2</sub>を用いた生ワクチンを接種した。接種前と接種より3, 5および7ヵ月後に血液を採集した。

96 wellマイクロプレート(Maxisorp, Nunc)に5 mg/ml rPAを含む0.1 M Carbonate buffer (pH 9.6)を各wellに50 ml加え、4°Cで一晩静置した。その後、Blocking buffer (3%スキムミルク in 0.01% Tween 20-PBS)を各wellに200 ml加え、37°Cで1時間静置した。その後、プレートを0.01% Tween 20-PBSで3回洗浄した。0.3%スキムミルク添加0.1% Tween 20-PBSに1,000倍希釈した血清を各wellに100 ml加え、37°Cで1時間静置した後、0.01% Tween 20-PBSで3回洗浄した。10,000倍希釈したHRP標識ウサギ抗めん羊、山羊IgG (Sigma)を各wellに100 ml加え、37°Cで1時間静置した後、0.01% Tween 20-PBSで3回洗浄した。洗浄後、50 mlのTMB基質(BD Bioscience)を各wellに加え、室温で30分間反応させた後、1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を50 ml加え、反応を停止させた。その後、プレート吸光度計(DU 530、BECKMAN)を用いて450

### SDS-PAGEによる 精製状況の確認



nmでの吸光度を測定した。また、陰性対照として、めん羊と山羊の非免疫血清を購入し（Sigma）し、陰性対照の吸光度をカットオフ値とし、それ以上を示した検体を抗体陽性とした。

## 2) 細菌毒素の検出法について

1. Stx1 と Stx2 の精製と家兎抗 Stx1 血清の作製：Stx1 クローン (*stx1/ pUC118/E. coli MC1061*) と Stx2 クローン (*stx2/ pCHR404/E. coli MC1061*) をそれぞれ強発現させて、その超音波破碎上清を出発材料に、Affinity クロマトとゲル濾過により単一蛋白まで精製した。精製 Stx はトキシド化して家兎を免疫してそれぞれに対する家兎抗血清を作製して、これからそれぞれの毒素に特異的な IgG を Affinity クロマトで調整した。
2. Stx1 及び Stx2 が同時に検出できる IC の構築：1 で調整した各毒素に対する特異 IgG で IC を作製して、現在、我が国で広く使われている IC 2 種類とその検出精度を比較した。
3. コレラ毒素 (CT) の精製：CT クローン (*ctf/ pUC118/ MC1061*) を強発現してその超音波破碎上清を出発材料に、硫酸塩析と Affinity クロマトを連続的に行ない、CT を精製した。
4. 毒素原性大腸菌の易熱性下痢毒素 (LTh) の精製：LTh クローン (*lth/ pBR322/ MC1061*) を強発現してその超音波破碎上清を出発材料に、硫酸塩析と Affinity クロマトを連続的に行ない、LT を精製した。
5. A 型ボツリヌス毒素重鎖融合蛋白の発現：A 型ボツリヌス菌 A62 株の whole cell DNA を template に PCR 法で A 型ボツリヌス毒素重鎖 (*btxA-Hc*) 遺伝子を pET28a にクローニングして、BtxA-Hc の N 末端にヒスチジンタグを導入した。構築したクローンの発現は Western blotting 解析で確認した。
6. SEA 及び SEB 融合蛋白の発現：黄色ブドウ球菌 824 株 (SEA、SEB、SHE 陽性株) の染色体 DNA を template にして PCR 法により、*sea* 及び *seb* 遺伝子をそれぞれ

pET28a にクローニングして、SEA 及び SEB の N 末端にヒスチジンタグを導入した。構築したクローンの発現は SDS-PAGE と Western blotting 解析で確認した。

## 3) 病原細菌のスクリーニングキットの作成

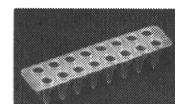
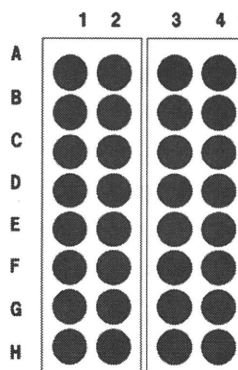
バイオテロのスクリーニング用に 9 種類の病原体をスクリーニングする特異プライマーと類縁菌のプライマーを合わせて 31 種類のプライマー (8 列 x 2 列の PCR チューブ 2 種類) をいれ凍結乾燥した PCR Plate (図 1)、を送付して 4 機関で同一試薬セットを作成した。送付元の岐阜大学、他の 3 か所はアプライド社の StepOne Plus Real time PCR 機器を保有する地方衛生研究所の協力をえた。送付した材料は表に示した、primer plate、PCR 酵素、標準 DNA を準備し、同じ条件で各機関のデータを比較できるように設定した。

plate に搭載した primer は 31 種類準備した。その詳細はリストは表 1 に示した。これらの評価に使用する標準 DNA、9 種類と類縁菌 DNA 縁菌 DNA と合わせて 15 種類を送付した。

## 送付材料

1. PCR plate: 8wellx4列 :20枚 (4度C 保存)
2. SYBR EX Taq: 1mlx5本 (4度C 保存)
3. 標準DNA液: 16本 (使用まで-20C保存)
4. PCR Seal: 50枚 (室温保存)
5. DEPC処理蒸留水10ml (DNA, RNase free, PCRの希釈液として使用)
5. Data Sheet: 4枚 (電子メールでも送付済み)

\*標準DNA液No1-9まで標的菌のDNA  
No10-16まで類縁菌のDNA



well	1列
1A	Bacillus anthracis 1(Edema factor)
1B	Bacillus anthracis 2(Lethal factor)
1C	Bacillus anthracis 3(Protective antigen)
1D	Bacillus anthracis 4(dnaJ)
1E	Bacillus cereus dnaJ
1F	Chlamydomphila psittaci (16S rDNA)
1G	Chlamydomphila pneumoniae (16S rDNA)
1H	Chlamydomphila pneumoniae dnaJ
Well	2列
2A	Burkholderia pseudomallei-mallei 1(Capsule)
2B	Burkholderia pseudomallei-mallei 2(chnA)
2C	Burkholderia pseudomallei-mallei 3(ITS3)
2D	Burkholderia thailandensis OMP
2E	Francisella tularensis 1(dnaJ)
2F	Francisella tularensis 2(fopA)
2G	Francisella tularensis 3(OMP tuM)
2H	Francisella novicida dnaJ

well	3列
3A	Yersinia pestis 1(F1 antigen)
3B	Yersinia pestis 2(Antiphagocytic toxin)
3C	Yersinia pestis 3(Plasminogen activator)
3D	Yersinia pseudotuberculosis (dna)
3E	Francisella tularensis-novicida(16S rDNA)
3F	Brucella spp 2.(31kDa OMP)
3G	Brucella spp 3.(16S rDNA)
3H	Brucella spp.(31kDa OMP)
Well	4列
4A	Coxiella burnetii 1(16S rDNA)
4B	Coxiella burnetii 2(dnaJ)
4C	Coxiella burnetii 3(hipA)
4D	Legionella pneumoniae dnaJ
4E	Clostridium botulinum toxin A
4F	Clostridium botulinum toxin B
4G	Clostridium botulinum proteolytic ABF (DnaJ)
4H	Clostridium botulinum nonproteolytic BFG (DnaJ) 内部control DNA添加

表1. 送付した Primer list

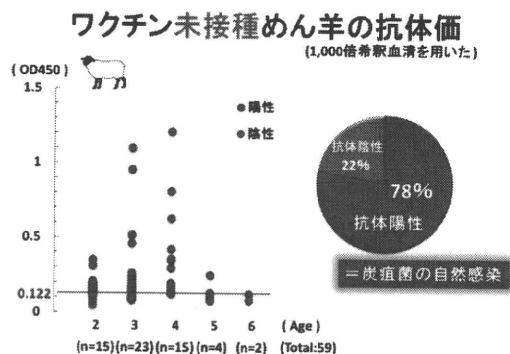
(倫理面への配慮)

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。なお本研究では人材料を使用せず、倫理規定に抵触する項目はない。

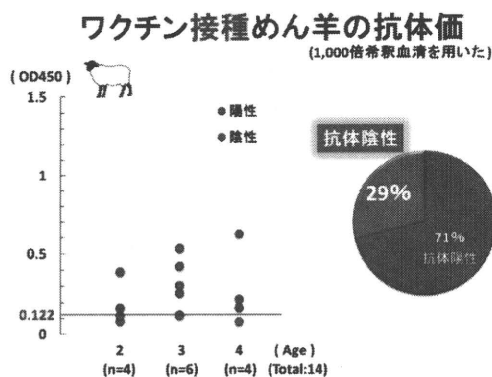
### C. 研究結果

#### 1) 炭疽菌の検出系

- めん羊 59 頭中 46 頭 (78%) が陽性を示した。畜齢別では、2 歳齢で 15 頭中 11 頭 (73%)、3 歳齢で 23 頭 17 頭 (74%)、4 歳齢で 15 頭中 15 頭 (100%)、5 歳齢で 4 頭中 2 頭 (50%)、6 歳齢で 2 頭中 1 頭 (50%) だった

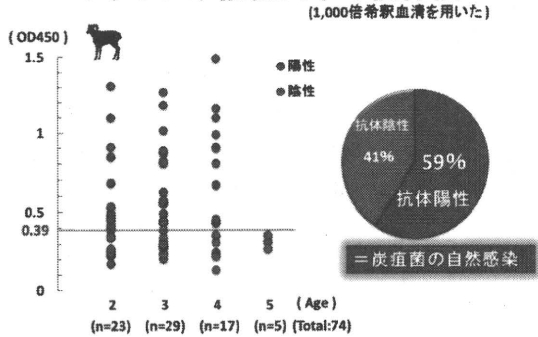


- ワクチン接種歴のあるめん羊 14 頭中 4 頭 (29%) が抗体陰性であった。畜齢別では、2 歳齢で 4 頭中 2 頭 (50%)、3 歳齢で 6 頭中 1 頭 (17%)、4 歳齢で 4 頭中 1 頭 (25%) であった



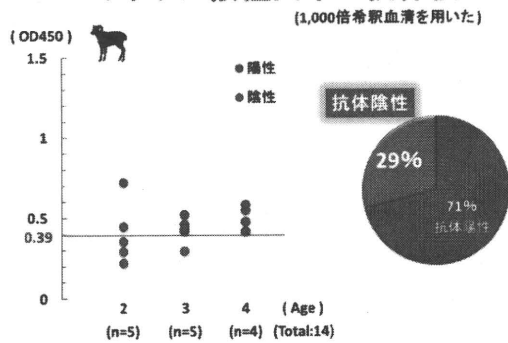
- 山羊 74 頭中 44 頭 (59%) が抗体陽性で、畜齢別では、2 歳齢で 23 頭中 14 頭 (61%)、3 歳齢で 29 頭中 19 頭 (66%)、4 歳齢で 17 頭中 11 頭 (65%)、5 歳齢で 3 頭中 0 頭 (0%) だった

## ワクチン未接種山羊の抗体価



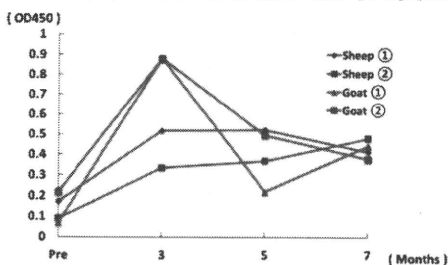
4. ワクチン接種歴のある山羊 14 頭中 4 頭 (29%) が抗体陰性であった。畜齢別では 2 歳齢で 5 頭中 3 頭 (60%)、3 歳齢で 5 頭中 1 頭 (20%)、4 歳齢で 4 頭中 0 頭 (0%) であった。これらの結果から、ワクチン接種歴のあるめん羊と山羊において、抗 PA 抗体の産生が十分産生されていないことが分かった。

## ワクチン接種山羊の抗体価



5. 炭疽の非流行地帯 (Dundgovi 県) で、めん羊と山羊それぞれ 2 頭ずつ使用し、ワクチン株 34-F2 株で免疫を行い (3, 5 および 7 カ月)、抗体価の推移を PA 抗原を用いた ELISA で経時的な変化を調べた結果、両動物種により抗体産生能が異なっており、更に抗体価の上昇も余り高い値にならなかった。

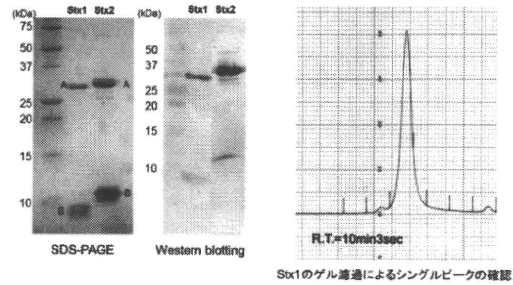
## めん羊・山羊抗体価の経時変化



## 2) 細菌毒素の検出法について

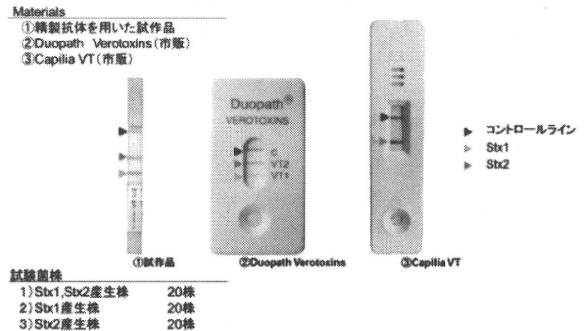
1. Stx1 と Stx2 の精製: 精製した Stx1 及び Stx2 は SDS-PAGE、ゲル濾過及び Western blotting 解析で単一蛋白であることを証明した (図 1)。

図1. 精製Stxsの純度検定



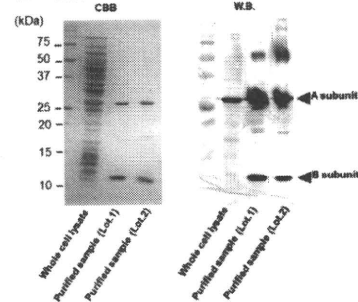
2. Stx1 及び Stx2 が同時に検出できる IC の構築: Stx1 及び Stx2 が同時に検出できる IC を構築し (図 2)、現在、国内で流通している IC と検出感度を比較したところ、Stx1 と 2 が区別できない IC と同程度で、Stx1 と 2 が区別できる IC よりも検出感度は高かった。

図2. 構築したICの検出感度の市販品との比較



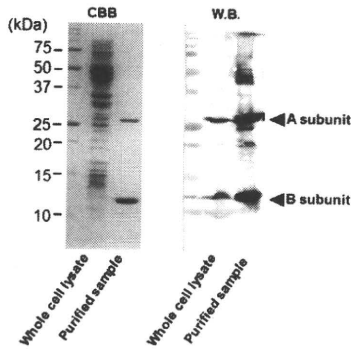
3. CT の精製: 精製した CT は SDS-PAGE 及び Western blotting 解析で単一蛋白であることを証明した (図 3)。家兎 1 羽を免疫できる精製 CT (0.626 mg) を作製し、現在、家兎を免疫をしている。

図3. 精製CTの純度解析



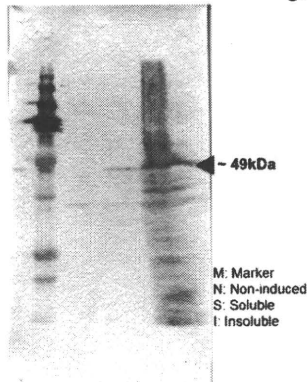
4. LTh の精製：精製した LTh は SDS-PAGE 及び Western blotting 解析で単一蛋白であることを証明した (図 4)。家兎 1 羽を免疫できる精製 CT (0.714 mg) を作製し、現在、家兎を免疫している。

図4. 精製LThの純度解析



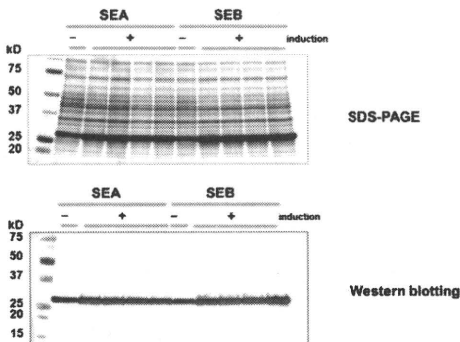
5. A 型ボツリヌス毒素重鎖融合蛋白の発現：構築したクローン (*btxA-Hc/pET28a*) を Western blotting 解析したところ、想定される位置にバンドが検出できた (図 5)。

図5. BtxA-Hc-HisのWestern blotting解析



6. SEA及びSEB融合蛋白の発現：構築したSEAとSEBの発現は強力で推定される分子量 (~26kDa) と一致し、抗His-Mabを用いたWestern blotting解析により融合蛋白であることを確認した (図6)。

図6. SEA及びSEBの発現



- 3) 病原細菌のスクリーニングキットの作成  
具体例を図 7 に示した。

ここではA型ボツリヌス菌をスクリーニングする primer として2種類を準備した。一つはA型毒素を増幅する遺伝子、もう一つは分類学的に16S rDNA 配列が同じで同一種として分類すべき、タンパク分解性ボツリヌス菌群 (A,B,F型毒素) を *dnaJ* 遺伝子で増幅する遺伝子を使用した。そのため、毒素はA型のみ増幅し、B毒素保有株は増幅しなかった。*dnaJ* では proteolytic な A,B,F 型をすべて増幅する primer を使用している。Tm 値 (76-77) はデフォルトのデータをそのまま記載するように要望したので、B施設の機械では本来、反応しない炭疽菌のところに目的と異なる Tm (79.5) が記載されている。Ct は 30 サイクルで陽性になっており、Total35 回の PCR 増幅を実施したので、ノイズと推測され、実際の増殖曲線を入力していないので、このピークがノイズか、実際に何らか増幅したのかは判定できない。少なくとも Tm 値が 2 ずれているため目標のサンプルの増殖ではないことが推定できた。

同じメーカーの Realtime PCR 機器を保有する4機関でのデータの比較をしたため、全体をつうじて Tm の値のずれは予想外に少なく 1% 以内に収まっていた。

ボツリヌス菌 A 型				
	菌株名	A 増幅	B 増幅	C 増幅
		C <sub>botulinum</sub>	C <sub>botulinum</sub>	C <sub>botulinum</sub>
1A	<i>Bacillus anthracis</i> factor	x	x	x
1B	<i>Bacillus anthracis</i> lethal factor	x	x	x
1C	<i>Bacillus anthracis</i> protective antigen	x	x	x
1D	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	(79.5, 30)	x
1E	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
1F	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
1G	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
1H	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
1I	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2A	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2B	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2C	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2D	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2E	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2F	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2G	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2H	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
2I	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3A	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3B	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3C	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3D	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3E	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3F	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3G	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3H	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
3I	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4A	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4B	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4C	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4D	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4E	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4F	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4G	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4H	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
4I	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5A	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5B	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5C	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5D	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5E	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5F	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5G	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5H	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
5I	<i>Bacillus anthracis</i> spore	x	x	x
6A	<i>Clostridium botulinum</i> toxin A	○ (76.6, 15)	○ (77.0, 15)	○ (76.6, 15) ○ (76.7, 23)
6B	<i>Clostridium botulinum</i> toxin B	x	x	x
6C	<i>Clostridium botulinum</i> proteolytic ABP ( <i>dnaJ</i> )	○ (79.7, 14)	○ (80.1, 14)	○ (79.7, 14) ○ (79.8, 22)
6D	陽性コントロール (T <sub>m</sub> 77.6)	陽性(77.6)	陽性(77.6)	陽性(77.6) 陽性(77.6)

図 7. ボツリヌス菌 A 型のデータ例  
x は増幅なし、○の後のカッコ内の数値は増幅と判断した well の Tm 値と Ct 値を意味する。



全体のデータ評価を行い下記のことが明らかになった。

### 1. 標的病原体の特異的検出と類縁菌の反応

各プライマーの類縁菌に対する特異性は primer ごとにことなるが、*Yesinia pestis* の病原因子 Pla 以外は予測道理のデータが得られた。*Yesinia pestis* の Plasmid 性の病原因子 primer のみが送付元と送付先でデータが異なっていた。この背景には使用した基準が病原因子を欠損しているため、基準株の DNA に病原因子を保有している菌株の DNA を添加したが、この添加量が少なく、送付先では検出できていなかった。4℃保存で DNA を液体の状態で送付したので、DNA の加水分解が進み検出感度以下に低下したと推測している。一般に 16S rDNA を検出する primer は特異性が低く、類縁菌と反応する場合があるが染色体上のコピー数が多いため同時に変異が起きる可能性は少ないので primer は安定している。一方 dnaJ は特異性は高いが、野生株には dnaJ に変異がある多型株が出現する可能性がある。病原因子はすべての標的株が持っているとは限らず、部分的に欠損した株もあるため、この 3 つの特異度が異なる primer を準備した。本来出るべき反応が陰性となり再度の試験で陽性になるなどデータの一部に解離がみられた。このような際の対応として一つの標的に対して複数の異なる primer、あるいは同じプライマーを複数 well 準備し、再現性を見る工夫が必要であった。

### 2. Tm 値の再現性

Tm 値は PCR 反応液のイオン濃度や機種により大きく変動する。今回は同じ DNA 液を使用し、同じメーカーの機器をしようとしたせいか、陽性反応の Tm 値が 1 以上に上昇するケースはまったくみられなかった。

### 3. Ct 値の施設間での変動

Ct 値はデフォルト値を採用したためか、施設ごとに大きく異なっていた。送付側の機器と近い値を示したのは A 施設で、B 施設、C 施設と Ct 値が大きくなる傾向があり、機器の感度設定が大きく異なると推測された。例えば *Brucella* の 31kDa 蛋白を検出する Primer

は送付元と A 施設では 10-12 であったが、B 施設では 15-16、C 施設では 20-21 と大きく増幅感度が異なっていた。

### 4. 偽陽性、偽陰性反応

デフォルトで測定しているためノイズが出現すると増幅曲線の微分で自動的にノイズの Tm 値が算出されていた。増殖曲線を確認すれば多くのケースではデフォルトで測定した Tm がノイズであることは判定できるが、予測値と異なる Tm 値が時折出現していた。

## D. 考 察

### 1) 炭疽菌の検出系

1. モンゴルでの家畜に対するワクチン接種に関して、ワクチン接種の徹底、ワクチンの品質管理、家畜種ごとの投与量、流行地域における追加投与、家畜の栄養状態を考えた接種など免疫誘導に影響を与える様々な要素の検討が必要である。
2. 山羊血清に関しては、めん羊と比較し、バックグランドが高くなった。詳しい原因は不明であるが、今後は、バックグランドを低減し、陽性血清のシグナルを増強するような ELISA の測定条件を検討する必要がある。

### 2) 細菌毒素の検出法について

食品を用いたバイオテロは使用された食品の流通状況によっては被害が広範囲におよび、通常の食中毒事例との違いが大きい場合は初動に遅れが出る可能性が大きい。

本年度に構築して市販化を始めた Stxs に対する免疫学的迅速同定法 (Immuno-chromatography: IC) は現在市販されている輸入品 (最も使用され感度の高いもの) と比較して、同等あるいはそれ以上の検出感度を示した。現在、精製した CT および LT で家兔を免疫中であり、力価の高い抗血清を作製後に CT 及び LT に対する家兔抗血清を作製して、IC を試作する。A 型 Btx の重鎖、SEA、SEB、腸炎ビブリオの TDH の発現に成功したので、これらについては指摘な培養・精製条件を確立して、順次、精製を行なう。

計画通りに細菌毒素の精製及び抗血清の作

製を行なった。最終的には一回の反応で細菌毒素を網羅的かつ高感度に検出する系を構築するが、個々の細菌毒素に対する迅速同定法 (IC) も構築して、その検査・診断マニュアルを作成してその普及を行なう。

3) 病原細菌のスクリーニングキットの作成  
評価結果から、乾燥 primer セットを今後配布する際の課題として下記の項目への対応が必要になることが明らかになった。

1. 機器の自動判定の不正確さ

実際の増幅曲線を比較していないので正確には評価できないが、デフォルトではなく一定の基準を設定して Ct 値を判定する方策が必要である。ベースラインをどう設定するかはサンプル、ノイズによって異なるので Rox 添加、内部コントロール値のデータと比較するなど内部陽性コントロールを利用した判定基準が必要になると判断した。

2. Rox および内部標準 DNA の必要性

今回は 32Well に分注する試薬は一度に混合し well に分注するため、ピペット捜査の誤差は出にくいと判断し、Rox の混合は支持しなかったが、機種之感度が異なることが判明したので、今後は Rox、内部標準、外部標準など標準物質の提供が必要になると反省した。

3. 一つの標的に複数の primer を準備する必要性

本来PCRで陽性になるべきところが陰性になったり、逆に陰性のはずのwellが陽性なる場合が、少数であったが出現した。一部は再試験で異なった結果が得られていた。このことからエラー、コンタミの可能性を考慮し一つの標的に複数のprimerを準備するか、人つのprimerを複数個所のwellに入れてエラー、コンタミをチェックできる方策が必要であった。

E. 結論

1) 炭疽菌の検出系

今回ワクチンに対する抗体価の上昇と自然感染後の耐過した動物の抗体価の区別が困難ではあったが、PA のリコンビナント抗原

を用いた ELISA の系は、動物の抗体かを調査するために十分使用できると考えられた。

2) 細菌毒素の検出法について

Stxs に対する免疫学的迅速同定法 (Immunochromatography: IC) を構築して市販化した。CTおよびLTの精製を行ない、家兎を免疫するのに充分量の精製毒素を作成した。A型Btxの重鎖とSEAとSEBの発現に成功した。

3) 病原細菌のスクリーニングキットの作成

4施設でのデータの比較を行い、スクリーニング用のprimerセットの評価と配布方法の課題を抽出した。おおむね、使いやすいとの良好の評価が得られたが、課題も残された。特に施設ごとに使用する機器が異なる現状から、陽性コントロール、標準DNAの配布方法、コンタミネーション対策、well間の汚染対策等の対応などの項目に対応したマニュアルの整理、スクリーニング方法をより客観的に評価できる工夫が必要であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Thanongsaksrikul J, Srimanote P, Maneewatch S, Choowongkamon K, Tapchaisri P, Makino S-I, Kurazono H, Chaicumpa W. A V<sub>H</sub>H that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. *J Biol Chem* 285: 9657-9666, 2010.
- 2) Akada KJ, Aoki H, Torigoe Y, Kitagawa T, Kurazono K, Hoshida H, Nishikawa J, Terai S, Matsuzaki M, Hirayama T, Nakazawa T, Akada R, Nakamura K. *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. *Disease Models & Mechanisms* 3(9-10): 605-617, 2010.
- 3) Uchida I, Makino SI et al. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal

replacement and characterization of the disseminated clone. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 in press

- 4) Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino SI, Hamabata T, Sawada K, Kato K. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. *Transgenic Res*. 2010 Oct 24. [Epub ahead of print]
- 5) 江崎孝行. 感染症法下での高度病原体の分譲活動と輸送方法の課題. *Microbiol Cult Coll*. 26:127-129, 2010.
- 6) 大楠清文、江崎孝行. 核酸増幅法による感染症の診断. *日本臨床*68:501-505, 2010.
- 7) 江崎孝行. ブルセラ症と炭疽. *公衆衛生* 75:19-22, 2010.

H. 知的財産の出願・登録状況  
特になし

## 7. 細菌毒素の迅速検出法の開発に関する研究

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、山本明彦 (国立感染症研究所)  
向本雅郁、幸田知子、小崎俊司 (大阪府立大学)  
鳥居恭司、銀永明弘 ((財)化血研)

研究要旨 他の細菌毒素と比較して致死活性が著しく高いため、バイオテロに使用される危険性が高いボツリヌス毒素を、現行国際標準試験法であるマウス接種法と比較して、迅速に且つ同程度の感度を備えた検出系を開発する。今年度は DELFIA システムと AlphaLISA を用いて A 型神経毒素の検出を検討した。DELFIA での検出感度は 1.7 pM とマウス接種法(10pg)に比べて 5 分の 1 程度と低かった。AlphaLISA は検出感度が 0.5 pM とマウス接種法とほぼ同程度で、測定時間が 2 時間と大幅に短縮されるため、ボツリヌス毒素測定系として有望である。また、ボツリヌス G 型毒素に対する診断用血清の作製は、高度免疫ウサギ血清を作製して、国内 3 研究所で標準化試験を実施中である。今後、検査機関に交付して実験室診断法の充実を図る。

### 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 および E 型菌が産生する毒素による発症報告が多い。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っては、検体からの検出には迅速で高感度の検出系が求められる。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発現して高濃度の場合には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 10~50 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、また毒素の弛緩性麻痺後の死亡確認を指標とする古典的判断基準による場合は最長 4 日を

要するため、簡易に迅速に検査する方法としては難点がある。さらに、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。昨年度構築したサンドイッチイムノ PCR 法よりも感度の点で一般的に優れていると考えられている DELFIA と AlphaLISA による検出系を構築し、他の検出系と比較した。DELFIA は ELISA における酵素の代わりにランタニド(ユーロピウム; Eu) を抗体にキレート標識し、蛍光を測定する。ランタニドは非特異的なバックグラウンドに比べて特異的蛍光の寿命が長く、高いシグナルを得ることができるため、高感度の検出系を構築することが可能になる。また、DELFIA アッセイでは標識分子はそれだけでは無蛍光だが、強酸性の増強試薬を添加することで蛍光特性を獲得する。蛍光強度の測定には専用の測

定装置を用いる。AlphaLISA は専用のストレプトアビジンドナービーズと抗体を化学結合させた専用の AlphaLISA アクセプタービーズを用いる。680 nm の波長を照射することでドナービーズが励起して一重項酸素を放出する。ドナービーズとアクセプタービーズが抗原を介して近接していると一連の化学反応が引き起こされ、最終的に放出される検出光を専用の機器で読み取り、数値化する。本アッセイ系は洗浄操作が不要で1チューブで行え、短時間で想定できる。バックグラウンドが低いいため検出感度が高いのが特徴である。また、マウス試験に用いる診断用型血清はA,B,EおよびF型の4種しか用意されていないために、本研究班ではG型の診断用血清を作製して検査を実施する地方衛生研究所に配布する。

## B. 研究方法

### (1) ボツリヌス毒素 in vitro 検出法の開発

1) DELFIA システムによる A 型神経毒素の測定法：一昨年、昨年にサンドイッチ ELISA およびサンドイッチイムノ PCR の検出系を構築する際に条件検討を行い、良好な結果が得られた A 型神経毒素に対するモノクローナル抗体 (mAb: 1F11) を固相化抗体とし、1F11 とエピトープの交叉がない mAb (8E10) をビオチン標識し、検出抗体として使用した。DELFLIA 専用の 96 ウェルイエロープレートに 0.1M リン酸バッファー(pH4.9)で 10 µg/ml に調製した固相化 mAb を各ウェルに 0.1 ml 添加し、37°C 2 時間静置し、プレートに固相化抗体をコーティングした。プレートを 1% スキムミルクで 4°C 一晩ブロッキングした後、A 型神経毒素を加え、37°C 2 時間反応させた。ビオチン標識 mAb (4µg/ml)、続いて Eu 標識ストレプトアビジン (100 ng/ml) をそれぞれ 37°C 2 時間反応させ、最後に Enhancement solution (PerkinElmer ; 0.2 ng/well) を加え 37°C で 5 分反応後、蛍光強度を EnVision (PerkinElmer) で測定した。なお、各反応終了時に、DELFLIA wash buffer (PerkinElmer) での洗浄を 3 回行った。

### 2) AlphaLISA による A 型神経毒素の測定法

PerkinElmer の標準プロトコールで調製された mAb (1F11) 結合アクセプタービーズ (80 µg/ml) とビオチン化抗 A 型神経毒素ポリクローナル抗体 (0.125 nM)、A 型神経毒素を AlphaLISA 標準バッファー (25 mM HEPES-HCl (pH 7.4), 0.5% Triton X-100, 0.1% Casein, 1 mg/ml dextran 500) で希釈後混合し、室温で 1 時間反応させた。ストレプトアビジン標識ドナービーズ (PerkinElmer, 40 µg/ml) を加え、さらに室温 30 分反応させた後、専用の測定器で 685 nm の波長を照射し、励起させ、615 nm の波長の強さを測定した。

### (2) G 型血清の作製：

菌の培養・毒素精製：Clostridium botulinum type G (G89 株) を初代培養としてクックドミート培地で 37°C 24 時間培養し、さらにペプトン-イースト-グルコース培地 (PYG) で 30°C 6 日間 本培養した。菌液は硫酸 (3N) を添加して pH4.0 で酸沈殿をおこない、室温で 1 夜静置した上清はサイフォンで除去後、7000rpm で 15 分遠心して沈殿を得た。沈査に 0.2M リン酸緩衝液 (pH6.0) を加えて毒素を抽出したのち 7000rpm で 15 分遠心する操作を 2 回繰り返し、上清を毒素液とした。10% トリプシンを毒素原液に 5% の割合で加え 37°C 1 時間処理して活性化した。活性化した毒素は 60% 硫酸アンモニウム塩で 2 回塩析・濃縮して部分精製毒素とした。その後、Sephadex G-200 によるゲルろ過、SP-Sephadex C-50 および Sephadex G-200 による再ゲルろ過で精製毒素を得た。

トキシイド化：精製 L 毒素 (3.51x10<sup>5</sup> マウス i.p.LD<sub>50</sub>/mg) を 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0-0.2% formalin で 0.4 mg/ml に希釈し、同 buffer で 30°C 14 日間透析してトキシイドを得た。

### (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) DELFIA システムによる A 型神経毒素の検出 (図 1): 反応系に関わる様々な試薬の濃度や反応時間の検討を行い、研究方法に示す最も感度が高く、バックグラウンドが低い条件を導き出した。サンドイッチ ELISA と検出感度を比較したところ、サンドイッチ ELISA での検出限界は 170 pM であるのに対して、DELFIA では 1.7 pM と 100 倍高い検出感度を示した。

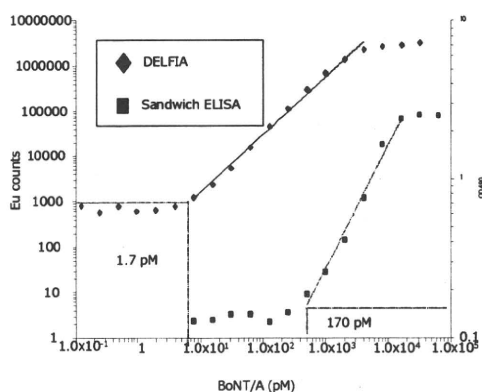


図 1. Sandwich ELISA法とDELFIA法のBoNT/A検出感度の比較

2) AlphaLISA による A 型神経毒素の検出 (図 2): 抗体結合アクセプタビーズおよびビオチン化抗体の濃度の検討を実施し、研究方法に示す最適条件を導き出した。A 型神経毒素の検出感度を測定した結果、検出限界は 0.5 pM と DELFIA と比較しても 3 倍以上の検出感度を有していた。

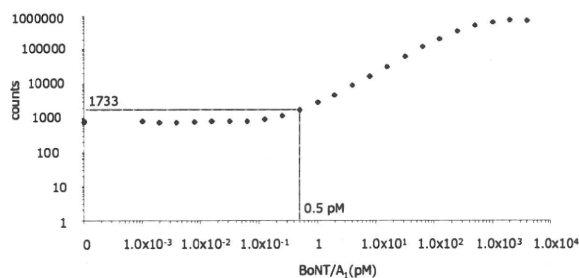


図 2. AlphaLISA法のBoNT/Aの検出感度

3) G 型診断用血清の作製: 無毒化確認試験: トキソイド L 毒素 10 mg/mouse をマウスに ip し、4 日間マウスの生死を観察した結果、マウスは発症せずに、無毒化が終了した。本トキソ

イドは使用時まで 4°C で保存し、使用する際、PBS で 0.2 mg/ml に希釈し、希釈したトキソイド量と等量のアジュバントと混合し、エマルジョンを作製した。最終濃度 0.1 mg/ml のトキソイドは 3 匹のウサギに 0.5 ml を 0.1 ml ずつ (50 mg/dose) 5 カ所に皮下注射で投与した。各ウサギの血中抗体を ELISA で測定した結果、3 匹とも免疫回数に依存して、良好な応答を示した (図 3)。

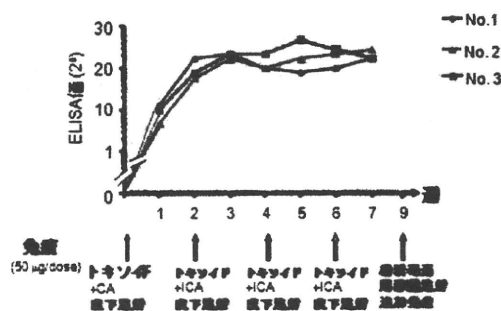


図 3. G型トキソイド接種後のウサギの免疫応答

### D. 考察

昨年度、検討したサンドイッチイムノ PCR 法は電気泳動したバンドの濃淡で判定するため定性的な要素が大きいが、今回検討した DELFIA と AlphaLISA は吸光度を測定するシステムで、定量的な測定結果が得られ、客観的に評価することができる。測定感度の点ではこれら 3 つに大きな違いはないが、AlphaLISA が最も高かった。また測定時間は 2 時間と短く、1 チューブでの反応系で洗浄操作も必要ないことから、検出系としては最も優れていると思われる (表 1)。しかし、AlphaLISA の測定には専用の測定機器が必要であり、高額 (300 万円前後) であることが AlphaLISA を普及するための課題である。

精製 G 型毒素のトキソイド作製時に、透析した蛋白濃度が比較的薄いのに関わらず、透析後の L 毒素には沈殿物が生じた。これは G 型毒素の特性と思われる。

表1. BoNT/A検出系の比較

		マウス接種法	Sandwich ELISA	sandwich immuno PCR	DELFLIA	AlphaLISA
検出限界	(pM)	0.3	$1.7 \times 10^2$	0.7	1.7	0.5
	(LD <sub>50</sub> /ml)	5	$2.8 \times 10^3$	11.6	$2.8 \times 10$	8.3
ダイナミックレンジ (log)		—	2	—	3	4
測定時間		4日	10時間	12時間	10時間	2時間

#### E. 結論

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DELFLIAとAlphaLISAを用いて、A型神経毒素の検出感度を測定した。DELFLIAでの検出感度はマウス接種法の5分の1と低かったが、AlphaLISAは同程度の検出感度を示した。反応時間や操作性の点からもAlphaLISAはボツリヌス毒素検出系として非常に優れていることが明らかとなった。

G型血清の作製について、菌の培養、毒素精製、トキシド化の免疫用抗原を調整した後、ウサギに接種して高い力価の血清を得た。国内3研究所において統一したプロトコールで中和試験をおこないEPより入手した標準品に標準化を実施中で、得られた結果を全国衛生微生物技術協議会理事会で承認を得て、地方衛生研究所へ配布する。

#### 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

#### 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

## 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)

協力研究者 小笠原由美子 (国立感染症研究所ウイルス第一部第五室)

花岡 希 (国立感染症研究所感染症情報センター)

研究要旨 リケッチア属は、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で、より簡便な検出法、診断法は十分確立されていない。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。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、リケッチア属を全般的に検出できる方法が望ましいと考えた。平成 21 年度に検討したリケッチアのゲノム情報を基にした *in silico* 解析から、平成 22 年度に開発した *Rickettsia japonica* 特異的な Real-time PCR に引き続き、*in silico* 解析によって得られた情報を LAMP 法を適応させた結果、開発した検出系は 100 コピーのターゲット DNA を 40 分以内で検出することができ、供試したほとんどの病原性リケッチアを検出できた。LAMP 法の測定機器は、全国の地方衛生研究所にほぼ同機能の機種が配備されており、全国のどのような地域でも同レベルで高感度かつ迅速なリケッチア属検出系が確立できることを意味し、リケッチア属によるバイオテロ対策に有効なツールになることが期待できる。

### A. 研究目的

リケッチアは紅斑熱やチフス熱を引き起こす偏性細胞内寄生菌でありマダニ等の節足動物を介してヒトへ感染する。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十分ではない。リケッチアによるバイオテロを想定した場合、広範囲のリケッチア種を迅速に検出できる検出系が求められている。

### B. 研究方法

リケッチア属検出 LAMP 法の開発

LAMP 法で使用した酵素や機器類はすべて、栄研化学の指定のものを用いた。LAMP 反応には LoopampDNA 増幅試薬キットを用いた。プライマーの作製には PrimerExplore (Ver. 4.0:<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)を用いた。反応測定機器には RT-160C を用

い、開始 0-7 分で 0 点平均補正、検出微分判定値を 0.01 に設定した。反応プログラムは、63 度で 60 分を指定した。反応組成を表 1 に示した。

	使用量
Reaction Mix (2 ×)	12.5 μl
FIP (40 μM)	1 μl
BIP (40 μM)	1 μl
Loop-F (20 μM)	1 μl
Loop-B (20 μM)	1 μl
F3 (5 μM)	1 μl
B3 (5 μM)	1 μl
Bst DNA polymerase	1 μl
template	1 μl
dH2O (滅菌蒸留水)	4.5 μl
Total	25 μl

表 1 LAMP 組成表



(倫理面への配慮)

臨床検体を使用するにあたり、国立感染症研究所倫理委員会の承認を得た検体を適用した。

### C. 研究結果

#### リケッチア属検出 LAMP 法の開発

1) プライマーの選定：平成 20 年度に抽出した 6 個のオルソロググループに対して、Primer Explore を用いてプライマーセットを設計した。その結果、5 個の ORF に対し、4 種類ずつのプライマーセットが効率よく作製できた。

2) LAMP スクリーニング結果：作製した計 20 種類のプライマーセットに対して、検出感度等の検査を行った。

ゲノム DNA には *R. asiatica*、*R. conorii*、*R. helvetica*、*R. honei*、*R. japonica*、*R. prowazekii*、*R. rickettsii*、*R. siberica*、*R. tamurae*、*R. typhi*、*R. heilongjiangensis*、Human、Mouse、No template control を用いてスクリーニングを行った。その結果、Probe set ID 164\_3 が検査したすべてのリケッチア菌種の DNA を測定することが出来た(表 2 に ORF ID164 の結果のみ示した)。選抜した Primer set ID 164\_3 について、検出時間を短縮させる Loop-primer

の作製を Primer Explore を用いて行った。作成方法は指定の方法に従った。作製した Loop-primer を使用して再度検定を行ったところ、検出リケッチアに変化はなかったが、検出時間を短縮することが出来た (Data not shown)。

3) LAMP 検出感度測定：詳細な検出感度を調べるために、Real-time PCR 感度測定で用いた *R. conorii* の ORF ID 164 を増幅した PCR 断片を用いた。

感度測定結果を図 1 に示した。結果から、検出感度は 100 コピーであった。検出感度の増幅を期待し、蛍光試薬 (Loopamp 蛍光目視検出試薬[栄研化学]) を用いて同様に検出を行ったが、検出結果に差は確認できなかった。

4) 臨床サンプルを用いた試験 (図 2)：

当室でこれまで確定していた *R. japonica* (日本紅斑熱)、*R. heilongjiangensis* (Far east asia tick bite fever)、*R. africae* (African tick bite fever)、*Orientia tustugamushi* (つつが虫病) の感染が確定していた患者検体各種を用い、その適用を検討した結果、*O. tustugamushi* を除くリケッチア感染症の患者から直接検出することが可能であった。

Primer set ID	Template ID														判定結果
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
164.1	x	○	x	○	x	x	○	○	x	x	○	x	x	x	x
164.2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	○	x	x	x	x
164.3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	x	x	x	⊙
164.4	○	○	x	○	○	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x
164.5	x	○	x	○	○	○	○	○	○	○	x	x	x	x	x

表 2 LAMP 法検出結果 \*

\* 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

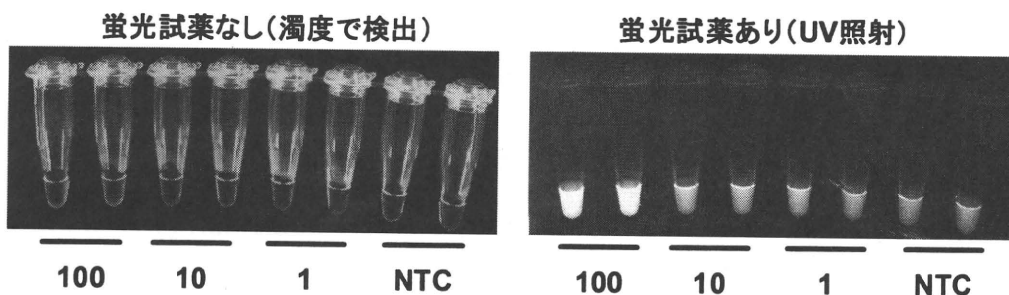


図 1 LAMP 感度比較結果

図中の数字は DNA コピー数を表している。NTC は No template control である。検出感度は 100 コピーまでで、蛍光試薬の有無で感度の差は認められなかった。

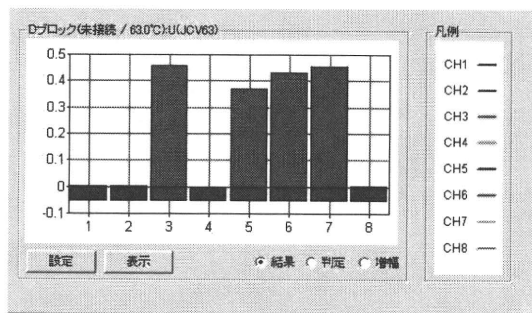


図2 臨床検体を用いたLAMP法の試行  
鑄型DNAの由来：

1. 全血 2008-3 (*O. tsutsugamushi* 陽性)
2. Eschar 2008-16 (*O. tsutsugamushi* 陽性)
3. Eschar 2008-31 (*R. heilongjiangensis* 感染)
4. Eschar 2008-47 (*O. tsutsugamushi* 陽性)
5. Eschar 2009-2 (*R. africae* 感染)
6. Eschar 2009-3 (*R. africae* 感染)
7. Eschar 2010-3 (*R. japonica* 感染)
8. 陰性コントロール (TE)

#### 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から選択したリケッチア属特異的なオルソロググループに対して、LAMP法を適応した。リケッチア属を全般的に検出できるプライマーセットを見いだした。検出感度が、100コピーまでと、Real-time PCRと比較すると若干低感度であるが、フィールドへの応用や簡便さの利点を考慮すると非常に有用な検出系であるといえる。また、蛍光試薬を用いた場合、TE存在の有無でバックグラウンドの上昇が問題となるが、ゲノムDNAやプライマー等の保存性を考慮した場合、バックグラウンド上昇よりも有用な点が多く、加えて、蛍光試薬の有無で感度の上昇が認められなかったことから、開発したLAMP系は100コピーのDNAを目視で判定する系としての運用が期待できた。

#### E. 結論

リケッチア属のみに高度に保存されている特異的な遺伝子配列群（オルソロググループ）に対して、DNA検出のための方法として、LAMP法について検討した。様々なリケッチア種などのDNAを用いて検討した結果、100コピーのDNAを40分以内に検出できる系

を開発した。迅速かつ簡便な本システムは臨床への応用が期待できる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) Ando S, Kurosawa M, Sakata A, Fujita H, Sakai K, Sekine M, Katsumi M, Saitou W, Yano Y, Takada N, Takano A, Kawabata H, Hanaoka N, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T. : Human *R. heilongjiangensis* Infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2010 16: 1306-1308.
- 2) Takeshita N, Imoto K, Ando S, Yanagisawa K, Ohji G, Kato Y, Sakata A, Hosokawa N, Kishimoto T. Murine typhus in two travelers returning from Bali, Indonesia: an under diagnosed disease. *Journal of Travelers Medicine.* 2010, 17:356-358.
- 3) Yoshii K, Mottae K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M, Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I. Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science (in press)*
- 4) 岩崎博道、安藤秀二、高田伸弘：肝リケッチア症. 日本臨床 肝・胆道系症候群I (第2版)、日本臨床社、別冊：140-144、2010年9月

##### 2. 学会発表

- 1) 花岡 希、川端寛樹、山本正悟、藤田博己、坂田明子、小川基彦、高野 愛、渡邊治雄、岸本寿男、白井睦訓、倉根一郎、安藤秀二。  
In silico 解析から新規に構築した日本紅斑熱迅速診断法とその応用. 第84回日本感染症学会総会（京都）平成22年4月
- 2) 安藤秀二. ダニ関連細菌感染症における遺伝子検出の意義と課題. 第84回日本感染症学会総会（京都）平成22年4月
- 3) 岸本寿男、安藤秀二、山崎 勉、尾内一信、中浜 力. ELISA法による抗*C. pneumoniae* IgM抗体測定キットの比較. 第78回日本

細菌学会北海道支部総会・第 28 回日本ク  
ラミジア研究会合同学術集会（札幌）平成  
22 年 9 月

- 4) 大屋賢司、黒田 誠、関塚剛史、Garry Meyers、  
岸本寿男、安藤秀二、福士秀人. オウム病  
クラミジア集団発生事例株の全ゲノム配  
列決定. 第 10 回人と動物の共通感染症研  
究会学術集会（東京）平成 22 年 10 月
- 5) 好井 健太郎、持館景太、大森優紀、千葉  
裕美子、真田崇弘、瀬戸隆弘、前田純子、  
小原真弓、安藤秀二、伊藤直人、杉山 誠、  
佐藤 浩、福島 博、仮和宏明、高島郁夫.  
日本国内におけるダニ媒介性脳炎の血清  
疫学調査. 第 10 回人と動物の共通感染症  
研究会学術集会（東京）平成 22 年 10 月

#### 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

## 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 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)  
井上 智、奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)  
高橋英之 (国立感染症研究所・細菌第一部)  
宇田晶彦、藤田 修、堀田明豊、棚林 清、山田章雄  
(国立感染症研究所・獣医科学部)  
片野晴隆、中島典子 (国立感染症研究所・感染病理部)

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のパフォーマンスを用いて WHO 指定バイオテロ病原体のゲノム配列及び変異情報データベースを充実させ、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。

昨年度は *Bacillus anthracis* 炭疽菌を中心にゲノム解読を行い、株系統解析法開発とゲノムワイドなキノロン耐性領域の探索を行った。本年度は他 WHO 指定バイオテロ病原体である *Yersinia pestis* ペスト菌、*Francisella tularensis* 野兎病菌、*Burkholderia pseudomallei* 類鼻疽菌のゲノム情報解析を行った。*Y. pestis* は世界的に3回のアウトブレイクが史実から知られており、その史実・ゲノム情報に基づいて由来不明の Yreka 株の系統関係を明らかにすることができた。バイオテロに使用された株の由来・起源をトレースし発生源を特定することと同じであり、株固有の SNVs が有用な情報源であることを示唆していた。*F. tularensis* においては、国内に根ざした系統の *subsp. japonica* の SNVs 情報を取得し、*japonica* による散発発生なのか、強毒型 *subsp. tularensis* によるバイオテロなのか明確に判別する遺伝情報を収集した。また、*B. pseudomallei* といった国内に根づいていない WHO 指定病原体のゲノム情報から、大陸ごとに特徴的な SNVs 情報も収集した。これら大陸・国・地域に特徴的な遺伝情報を包括的に取得し、かつ系統分類解析法を整備し、有事において正確な判断を処する基盤を整備した。

また、WHO 指定バイオテロ病原体のみならず未知病原体および知能犯による人為的病原体への対応・セーフティーネットは不可欠である。本研究課題の一つとして、インフルエンザウイルス剖検検体を用いて模擬演習をし、正確に病原体候補を検出することができた。

### 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。