

細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法 およびワクチンの開発

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部

江崎孝行 国立大学法人岐阜大学・医学部

川本恵子 帯畜大・動物・食品衛生研究センター

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に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険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。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

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’による多数の摸倣事件が起こり、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 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、特に特定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。

今年度、本研究班では、炭疽ワクチンに用いる候補抗原の検討、リシンに対する特異抗体の作成、細菌性毒素の検出系のキット化への取り組みを行なった。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、グラム陽性の芽胞形成桿菌で、人獣共通感染症の炭疽を引き起こす微生物である。炭疽は、感染経路の違いにより、皮膚炭疽、肺炭疽、腸炭疽の3つの病型をとる。そのうち、肺炭疽は本菌芽胞の吸入によって引き起こされる致死率の高い感染症である。現在、米国や英国で用いられているヒト用ワクチンは、毒素産生株の培養上精を用いた成分ワクチンであり、その接種対象は限られている。また、十分な免疫効

果を維持するために、複数回の筋注投与と年1回の追加投与が必要であり、接種による副作用も報告されるなど、簡便性および安全性が問題視されている。そのため、有事の場合の大量免疫に使用できず、より安全で、より有用なワクチンの開発が必要とされている。

本研究では、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞表層タンパクに着目し、炭疽に対する防御効果について検討した。投与方法については非侵襲性である粘膜免疫を用いた。

リシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク毒素で、分子量約30 kDaのAサブユニットと分子量約32 kDaのBサブユニットからなり、天然有機化合物のなかでも毒性の強い化合物の一つである。リシン毒素はA、B二つのサブユニットから構成される。毒素活性を持つのはAサブユニットで、Bサブユニットは標的細胞の受容体に結合し、Aサブユニットを細胞内へと輸送する。リシンの致死量は、成人の場合、20-30 µg/kgで、吸入で約4-8時間、経口投与では、約10時間で中毒症状が現れる。現在のところ、本毒素に対する有効な解毒剤は存在しない。また、これまでにテロや犯罪における使用歴がある。そのため、本毒素の迅速検出法は、安心・安全な社会構築のため急務である。毒素の致死量が低く、リシンと同様の症状を示すその他の細菌毒素も存在することから、高感度で、類症鑑別も可能となる検出法の開発が望ましい。本研究では、細菌毒素検出に加え、テロ使用での危険性が高い植物毒素であるリシンの検出法開発も併せて行う。

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)、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が、本研究では、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。CTおよびLTに対する家兔抗血清を作製して各毒素に対

するELISA系を構築し、それぞれの抗血清の特異性の検証を行なった。更に、SEAとSEBの精製法を確立して家兎抗血清を作製するのに十分なSEA及びSEBを精製した。

B. 研究方法

B-1. 網羅的抗原・抗体検出系

1. 野兎病に対する免疫学的診断法の構築：

精製 FopA-GST を固相に結合させて、患者血清、Conjugate (抗ヒト IgG 山羊 IgG-AP)、発色基質の順に反応させるサンドイッチ ELISA 系を構築した (図 1)。

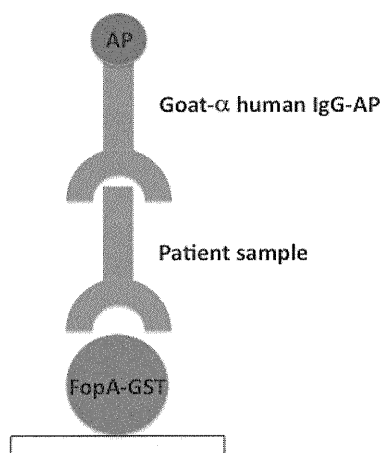


図 1. 野兎病に対する免疫学的診断法

構築した免疫学的診断法を検証するために野兎病患者血清の収集を行なった。大原総合病院附属大原研究所の藤田博己博士から患者血清の分与を受けた。

2. リシン毒素検出系の構築：

リシンのトウゴマからの抽出は、化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律に抵触するため、実験室レベルの検討に使用することは困難である。そこで、毒素活性は持たないが毒素の構成成分として必須である B サブユニットの組換え体を作製し、これを抗原として高親和性の抗体を作製することとした。

NCBI 遺伝子データベースのリシン B サブユニット (以下、RTB) の塩基配列を元に、RTB のヌクレオチドを合成した。これにリンカー配列を付加し、pET-32 ベクターにクローニングし、発現ベクターを構築した。定法に従い、大腸菌組換えタンパク発現システムにより、可溶型 RTB 組換えタンパク (以下 rRTB) を精製した。

rRTB100 μ g を抗原として等量の TiterMax と混合して抗原液を調整し、定法に従い、BALB/c マウスおよび家兎に免疫した。免疫前および免疫後の血液を定期的に採取し、血清中の抗 rRTB 抗体価を ELISA により測定した。抗体価の上昇を確認後、Porotein A あるいは Protein G カラムにより抗血清から IgG 抗体を精製した。得られた抗体の反応性と特異性については、ELISA とイムノブロットにより検討した。

3. 大腸菌の産生する易熱性下痢毒素 (LT) 検出系の構築：

精製 LT で常法に従って家兎を免疫し抗 LT 家兎血清を作製した。この抗 LT 家兎抗血清に対して精製 LT を結合させたアフィニティカラム (HiTrap NHS-activated HP) を用いてアフィニティ精製を行い、抗 LT 特異 IgG を調整した。抗 LT 特異 IgG、ビオチン化抗 LT 特異 IgG、Alkaline Phosphatase Streptavidin、p-Nitrophenyl phosphate を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築した。

4. コレラ毒素 (CT) 検出系の構築：

精製 CT で常法に従って家兎を免疫し抗 CT 家兎血清を作製した。この抗 CT 家兎抗血清に対して精製 CT を結合させたアフィニティカラム (HiTrap NHS-activated HP) を用いてアフィニティ精製を行い、抗 CT 特異 IgG を調整した。抗 CT 特異 IgG、ビオチン化抗 CT 特異 IgG、Alkaline Phosphatase Streptavidin、p-Nitrophenyl phosphate を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築した。

5. ブドウ球菌エンテロトキシン A 型 (SEA) 及び同 B 型 (SEB) の免疫用抗原の精製：

SEA および SEB を code する遺伝子断片は PCR 法により調整し、シークエンス解析を行って配列が正しいことを確認した。sea 及び seb 遺伝子はタンパク発現用ベクターである pET28a にクローニングしてタンパク発現用大腸菌 BL21 (DE3) 株にトランスフォーメーションした。得られたクローンの SEA 及び SEB の発現とその可溶性は、IPTG 誘導後の SDS 電気泳動と Western blotting 解析で確認した。

発現して可溶性画分に抽出できた SEA 及び SEB は常法に従って Ni-NTA レジンにより精製した。この精製 SEA および SEB の精製度は免疫源としては低いと考えたので、この標品を更にゲルエリユーション法で精製した。

B-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

本年度は、炭疽菌芽胞の表層タンパク質の同定とその粘膜免疫における免疫原性について検討した。

本研究では、*B. anthracis* Pasteur II 苗の病原性株 (pXO1+, pXO2+) 及び非病原性株 (pXO1-, pXO2-) を使用した。非病原性株から芽胞を高純度に精製し、4%パラホルムアルデヒド固定により不活化した後、家兎に免疫し、抗炭疽菌芽胞抗体を作製した。

続いて、病原性および非病原性株芽胞から芽胞タンパクを抽出し、SDS-PAGE に展開後、タンパクを PVDF 膜に電気的にトランスファーし、前述の抗炭疽菌芽胞抗体を用いてイムノブロットを行った。反応性を示すバンドをゲルから切り出し、回収した。ゲル片を MilliQ 水で振とう洗浄、脱色し、アセトニトリルと炭酸水素ナトリウム水溶液処理を行った。乾燥させたゲル片に 10 mM ジチオトレイトール (DTT)/25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加え、56°C で 45 分間インキュベートした。チューブを室温に戻した後、25 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解した 55 mM ヨードアセトアミドを加え、遮光しながら 30 分間処理し、タンパク質をアルキル化した。洗浄後、25 mM 炭酸水素アンモニウムで 20 倍希釈したトリプシン溶液 (5 µg/ml) で 37°C で一晩インキュベートし、トリプシン消化した。10 分間ソニケーションすることによりペプチドを抽出し、1% TFA/50%アセトニトリルを加え、タンパク抽出液を得た。抽出液は遠心濃縮した。サンプルを Pre-spotted Anchor Chip に 1 µl アプライし、TFA 処理後、乾燥させ、質量分析によりスポット上のペプチド断片を Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) により質量分析を行った。測定条件は、リニアモードで、レーザは 110 ns でパルス照射した。キャリブレーションは、Anchor Chip に付属したものをを用いた。得られたスペクトルは、蛋白質同定ソフト MASCOT を用いて解析し、該当するタンパク質を同定した。

上述の方法により、同定されたタンパクの組換えタンパクを作製した。炭疽菌ゲノムから、該当タンパクをコードする遺伝子を PCR により増幅し、これを pGEX-6P-1 ベクターにクローニングし、GST タグ付加組換えタンパク発現ベクターを構築した。これを BL21 (DE3) に導入し、定法に従い、目的のタンパクを精製した。GST タグは生成過程でカラ

ムオンダイジェストにより、組換えタンパクから外した。

同定タンパクの炭疽菌での発現解析に使用するため、上述の精製組換えタンパクを家兎に免疫し、特異抗体を得た。

免疫染色は、4% PFA で不活化した炭疽菌芽胞を用いた。非特異反応を防ぐために 3% skim milk in T-PBS により 30 分間ブロッキング後、特異抗体を 1 次抗体、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、免疫染色を行った。染色した芽胞は、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにより観察した。すなわち、スライド上に染色芽胞を載せ、ProLong Gold で封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。取得した画像は DP70-BSW ソフト (Olympus) により解析した。また、フローサイトメーター解析では、FACSCantII (Becton Dickinson) を用いてデータを取得し、FACSDiva ソフト (Becton Dickinson) で解析した。

続いて、同定した芽胞表層タンパクの粘膜免疫での抗原性や有用性を検討するため、以下の方法により粘膜免疫した。実験動物には 6 週齢の雄の BALB/c マウスを用い、ジエチルエーテルを用いて軽く麻酔した後、鼻孔より 10 µg となるように 5~10 µl の組換えタンパクを投与することで経鼻免疫した。投与スケジュールは、週 1 回あるいは 3 回×3 週間で行った。アジュバントを用いた免疫では、組換えタンパク単独又は 5 µl のアジュバントと組み合わせて週 1 回又は週 3 回×3 週間投与した。アジュバントには合成二本鎖 RNA の poly (I:C) を用いた。各群のマウスは定期的に採血を行い、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。

(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

C-1. 網羅的抗原・抗体検出系

1. 野兎病に対する免疫学的診断法の構築：

大原総合病院附属大原研究所に保管されて

いる野兎病患者血清から、37 サンプル (26 名分: 男性 20 名、女性 6 名、採取時期: 1985-1997 年、凝集価: 40-320) を分与頂いた。

2. リシン毒素検出系の構築:

抗 rRTB 免疫抗体を用いたイムノブロットの結果を図 2 に示す。レーン 1 は、発現大腸菌のペレット、レーン 2 はそこから精製した rRTB を示す。図中の矢印で示すように、rRTB の分子量である約 25 kDa の位置に陽性バンドが検出された。天然リシンの B サブユニットの分子量は約 33 kDa で、rRTB との分子量に違いがあるが、これは大腸菌発現系により糖鎖の付加がないためと考えられる。

続いて、リシンと相同性の高い細菌毒素を用いて、本抗体の反応特異性について検討した。アミノ酸配列から、リシン B サブユニットと最も近縁である志賀毒素 Stx1, Stx2 および志賀毒素の亜型である Stx2e の他、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B、コレラ毒素の各毒素を還元条件で SDS-PAGE で分離し、抗 rRTB 抗体を用いてイムノブロットを行った。図 3 に示すように、抗 rRTB 抗体は、rRTB にのみ特異的な反応を示した。



図 2 抗 rRTB 抗体の反応性

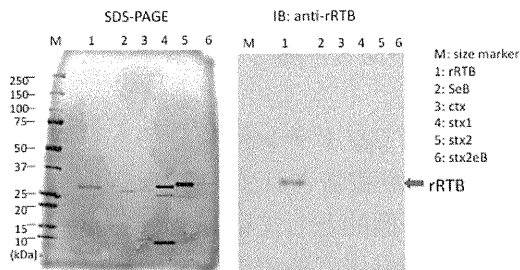


図 3 抗 rRTB 抗体の反応特異性

3. 大腸菌の産生する易熱性下痢毒素 (LT) 検出系の構築:

抗 LT 家兎血清はオクタロニー法で 16 倍以上と高い力価を示した。構築した LT に対する ELISA 系の検出限界は 5 ng/ml で、CT との識別も可能であった (図 4-A)。

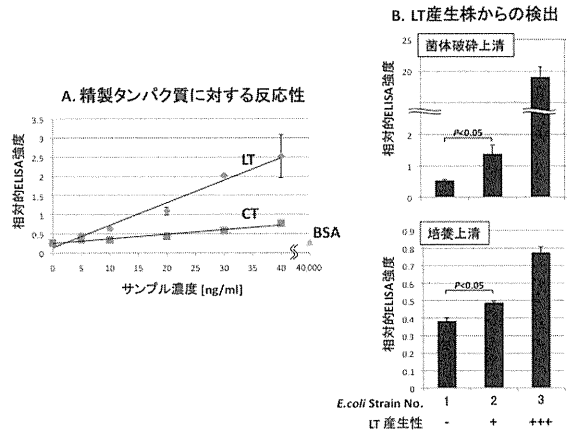


図 4. 抗 LT IgG の特異性及び感度

更に、LT 産生臨床分離株を用いて検討したところ、菌体及び培養上清から LT が検出可能である事が分かった (図 4-B)。

4. コレラ毒素 (CT) 検出系の構築:

抗 CT 家兎血清はオクタロニー法で 16 倍以上と高い力価を示した。構築した CT に対する ELISA 系の検出限界は 20 ng/ml で、LT との識別も可能であった (図 5)。

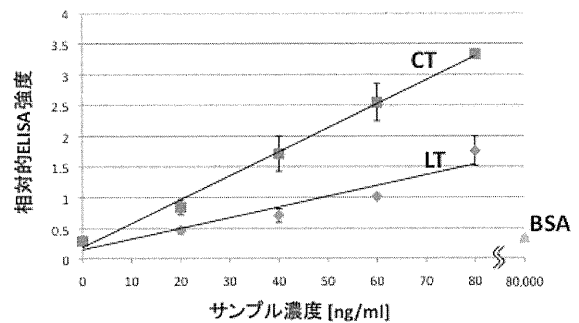


図 5. 抗 CT IgG の特異性及び感度

5. ブドウ球菌エンテロトキシン A 型 (SEA) 及び同 B 型 (SEB) の免疫用抗原の精製:

SEA および SEB は可溶性画分に発現し、Ni-NTA カラム精製及びゲルエリユーシヨ

ンにより単一なバンドとして精製でき、免疫源として十分な量も確保できた（図 6 及び図 7）。

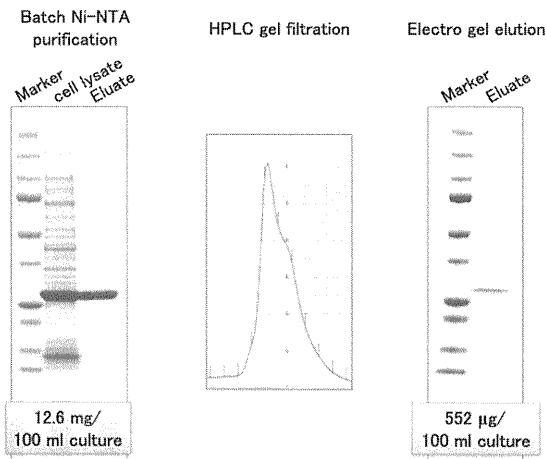


図 7. SEA の精製

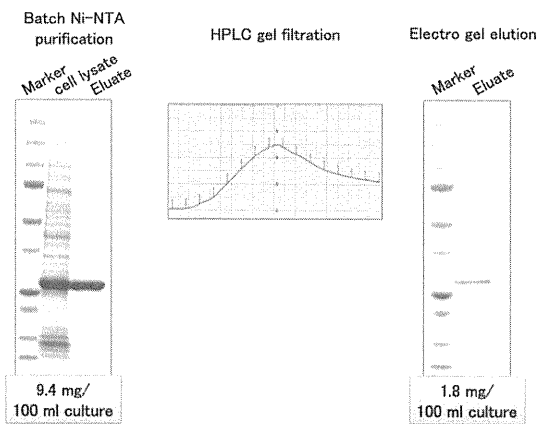


図 8. SEB の精製

C-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

新規ワクチン候補分子を探索するため、炭疽菌の感染型である芽胞の表層タンパクの同定を行った。炭疽菌の病原因子は pXO1 および PXO2 の二つの病原プラスミドに多く存在しているが、プラスミド上の因子は環境などにより容易に脱落することがあるため、染色体上にコードされており、かつ炭疽菌表層に存在する分子を標的とした。そのため、両病原プラスミドを持たない非病原性株の芽胞を抗原として、抗炭疽菌芽胞抗体を作製し、この抗体と反応する分子を同定することで、新規候補分子を得た。図 9 に示すように、イムノプロット解析に

より、抗炭疽菌芽胞抗体と反応する 3 つのバンドが、それぞれ分子量約 100-250, 100 および 75kD に相当する位置に観察された（図 4、星でマークしたバンド）。

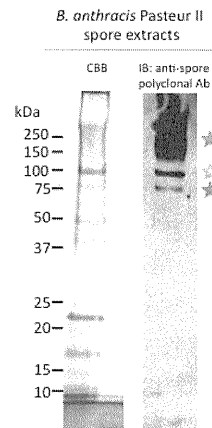


図 4 抗炭疽菌芽胞抗体と反応する芽胞表層タンパク

これらのタンパクは炭疽菌芽胞表層に局在し、かつ免疫原性を有すると考えられた。そこで、これらの分子を特定するため、質量分析計により該当するバンドの MS スペクトルを解析し、タンパクを同定した。その結果、分子量 100-250 kDa のタンパクは BclA、100 および 75 kDa のタンパクは EA1 であった。図 4 に EA1 の MS スペクトラムを示す。

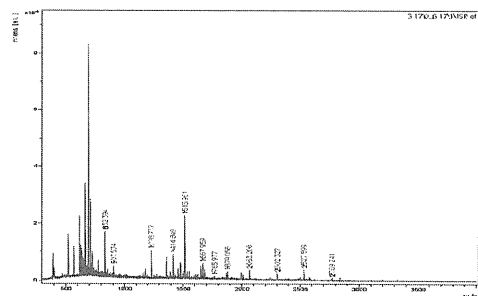


図 5 EA1 の MS スペクトラム

BclA は既報でワクチン候補分子として有用性が低い事が報告されているので、本研究では EA1 を標的として研究を行った。

EA1 が実際炭疽菌表層に存在しているかを検討するため、組換え EA1 タンパク（以

下 rEA1) を作製し、さらに rEA1 に対する特異抗体を作製した。抗 EA1 抗体で炭疽菌を免疫染色した結果を図 6 に示す。

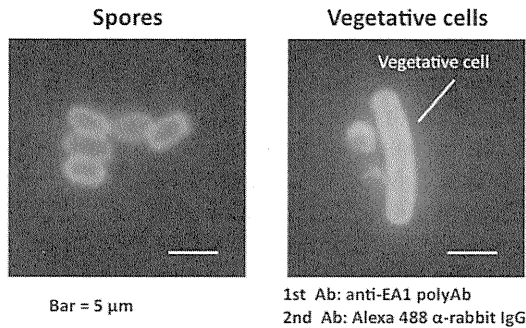


図 6 炭疽菌における EA1 タンパクの局在性

この結果から、EA1 は炭疽菌芽胞だけでなく栄養体の表層にも局在することが明らかとなった。また、フローサイトメーターにより同様の解析を行った (図 7)。その結果、EA1 は炭疽菌芽胞表層に高発現していた。また、炭疽の近縁種である *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* には EA1 の発現はほとんど観察されなかった。

本研究では、簡便なワクチン投与方法として粘膜免疫によるワクチン開発を目指している。rEA1 が粘膜免疫においても抗原性を有し、十分な抗体産生を誘導しうるかどうかを検討した。その結果、週 3 回×3 週間

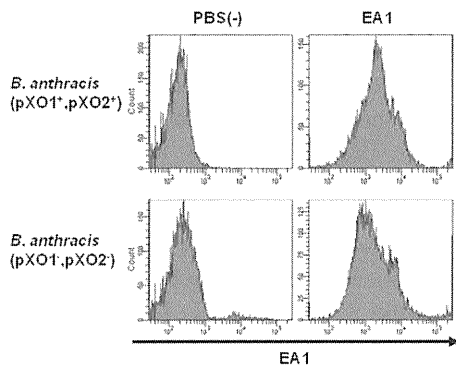


図 7 フローサイトメーターによる解析

の経鼻投与で、血中だけでなく、糞便および唾液などの粘膜においても抗体産生を誘導できることが分かった (図 8)。

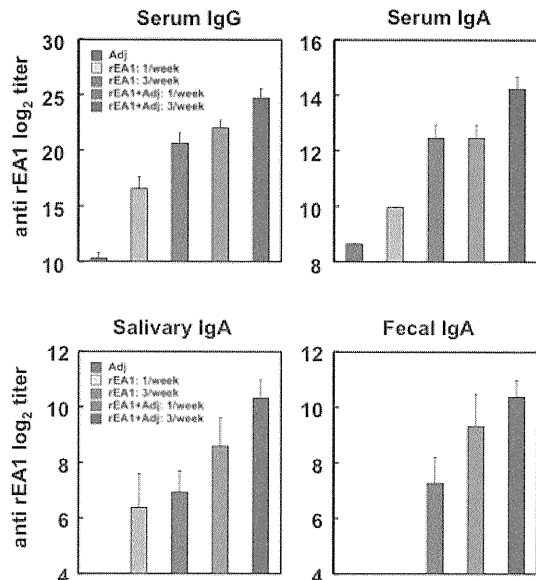


図 8 rEA1 経鼻免疫による抗体産生誘導

D. 考 察

D-1. 網羅的抗原・抗体検出系

本年度は、リシン検出系に応用する抗体を得るため、rRTB 抗体の作製を試みた。本検討により、rRTB 抗体はリシンに特異性が高く、検出系の利用に有用であることが示唆された。検出感度を上げるため、高親和性抗体の作製を検討している。さらに、エピトープ検索を行い、より精度の高いリシン迅速同定法を構築する予定である。

抗 LT 及び抗 CT 家兎特異 IgG を用いた両毒素に対する免疫学的検出系 (ELISA) の検出限界はそれぞれ 5 ng/ml 及び 20 ng/ml であった。2 次抗体に用いる家兎 IgG を Fab' にすることで更に感度を上げる予定である。

SEA 及び SEB の精製に成功してそれぞれ 552 μg と 1.8 mg の免疫源が準備できたので、ウサギの免疫を行なう予定である。

D-2. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

現行のヒト用炭疽ワクチンは炭疽菌が産生する毒素の一つである防御抗原 (PA) を主成分としたものである。これは、莢膜欠損株の培養上清を用いた crude なもので、副作用が問題視されている。さらに、免疫効果を維持するために、複数回の筋注を必要とする。そのため、現行のターゲットである毒素より初期の段階をターゲットとするこ

とで、より高い防御効果が期待できるのではないかと考えた。また、有用な成分のみを含む成分ワクチンがより安全なものへと繋がっていくと考えられる。そこで、芽胞をターゲットしたより効果的なワクチンの開発を目指して、芽胞表面タンパクに着目した。本研究により、抗芽胞抗体が認識しているタンパクが、イムノブロット及びMALDI TOF MSによりEA1であると特定された。このタンパクは、免疫染色の結果、芽胞及び栄養体の表面に存在しており、病原性の高い株に多く存在していた。そのため、EA1による免疫が、芽胞及び栄養体に対する2重の防御効果が期待できるのではないかと考えられる。また、これまでの侵襲性のワクチンで問題となっていた接種部での副作用及び接種を簡便に行うために、非侵襲性の経鼻投与によりrEA1を用いてマウスを免疫した。経鼻免疫により、粘膜及び全身の免疫が誘導されていたことから、単独での免疫原性があることが分かった。さらに、アジュバントとして合成2本鎖RNAのpoly (I:C)を用いることで、より高い免疫効果を得ることができた。本研究から、rEA1が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性が示唆された。今後は感染実験により、炭疽発症予防効果を検討していきたい。また、本分子は、その存在部位から、人体、環境からの炭疽菌検出系への応用も期待できる。

E. 結 論

1. リシン検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。
2. CT及びLTに対するELISA系を構築した。
3. SEA及びSEBの精製に成功して十分な免疫源が準備できた。
4. 炭疽菌の芽胞および栄養体の表層に存在する抗原性の高い分子を特定した。
5. 簡便で大量免疫にも応用しうる炭疽ワクチンの新規候補分子を同定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol*. 2012 Jan 19.
2. Chaisowong W, Kusumoto A, Hashimoto M, Harada T, Maklon K, Kawamoto K. Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under Cold Stresses Conditions: Its Potential for Public Threat. *J Vet Med Sci*. 2012 Feb 1;74(1):43-50.
3. Asakura H, Kawamoto K, Okada Y, Kasuga F, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evol*. 2012 Jan;12(1):94-101.
4. Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(8):1325-9.
5. Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino S, 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*. 2011 Aug;20(4):735-48.
6. Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, and Kohno S: *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci*, 56: 999-1006, 2011.
7. Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-nguan M, Indrawattana N, Sookrung N, Tapchaisri P, Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W: Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res*, 133: 387-394, 2011
8. Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K-I, Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, Ishiguro I: Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore

- hocks-affected rabbits. *Amyloid*, 18: 112-118, 2011.
9. Chulanetra M, Sookrung N, Srimanote P, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Chongsang-nguan M, Kurazono H, Chaicumpa W: Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. *Toxins*, 3:1249-1262, 2011.
 10. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada-K. J, Nakamura K, Moss J, Hirayama T and Kurazono H: *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*, *In press*, 2012.
 11. Van Hung P, Zhang J, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on dnaJ, 16SrDNA, groEL, and rpoB gene sequences. *Microbiol Cult Coll*, 27: 1-12, 2011.
 12. Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 307-315, 2011.
 13. Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 395-398, 2011.
 14. Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61: 1927-1932, 2011.
 15. 大楠清文, 江崎孝行: 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践、*医学のあゆみ* 237 巻: 193-199、2011 年。
 16. 江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張継偉, 大楠清文: 新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望- 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査、*化学療法の領域* 29 巻: 2006-2020、2011 年。
 17. 大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応、*日本化学療法学雑誌* 59 巻: 441-453、2011 年。
- H. 知的財産の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究」
研究分担報告書

バイオテロ危機発生時への対応
－地衛研のこれまでの研究成果と今後の課題－

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	三觜 雄	札幌市衛生研究所
	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	小林慎一、皆川洋子	愛知県衛生研究所
	杉浦義紹、田中敏嗣	神戸市環境保健研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究分担者	宮崎 義継	国立感染症研究所

研究要旨

過去三年間にバイオテロに使用される可能性のある病原体の網羅的検出法の構築と評価を行った。可能性のある病原体の中のウイルスと細菌については、研究協力地衛研がその技術を維持している。今年度はバイオテロ対象病原体の一つである真菌について、網羅的測定キットの作製（感染研）とそれを用いて地衛研で測定精度の評価を行った。その結果、研究協力の 8 地衛研では、ブラインドサンプル； *Candida albicans*、*Aspergillus fumigates*、*Cryptococcus neoformans*、を特定することが出来た。しかし、この評価の過程を通して検査精度のさらなる向上が様々な角度から提言された。

A. 研究目的

これまでバイオテロ対象病原体検出法の標準化の作製を目的とした本班において、初年度は、過去のバイオテロ健康危機事例に地方衛生研究所の対応について評価した。即ち 1990 年 4 月～1995 年 3 月：オーム教によるボツリヌス毒素散布

（神奈川県庁、皇居周辺）、2001 年 9 の米国における炭疽菌芽胞によるバイオテロ事件から、本邦では「白い粉事件」として 2,000 件以上の摸倣事件があった。本班研究分担研究では白い粉事件の詳細な調査を行った。その結果、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、対応には迅速な検査結果が求められていたこと、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専門性をもって常備されなければならないことが判明した。

二年目は国立感染症研究所でウイルスを対象にバイオテロ関連特定病原体の網羅的スクリーニング検査・検出キットが作成された。危機発生時には現場で検査対応するのは地衛研あり、危機発生時での対応を想定してこの検出キットの操作性、精度等の評価を 8 地衛研が研究協力者として行った(2009 年度)。三年目は 牧野(帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター)・江崎(岐阜大学大学院医学系研究科)両先生開発のバイオテロ特定病原体の中の病原細菌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(2010 年度)。今年度はバイオテロ対象病原微生物である真菌を対象に、これまでと同様に国立感染症研究所で作製された網羅的迅速検出法について、検出精度の評価を行った。

その成果を報告する。

B. 研究方法

国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象の真菌の迅速網羅的検出法に従った。即ち、遺伝学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう事とした。

1) 方法

共同プロトコールとして評価機関に試薬・サンプルと共に送付された(表 1)。

2) 配布サンプル(再掲載)

①Positive control (PC); *Candida*

albicans genome DNA

② Negative control (NC); *Klebsiella pneumoniae* genome DNA

③ blind DNA sample 1 (1)

④ blind DNA sample 2 (2)

⑤ blind DNA sample 3 (3)

⑥ PCR premix NL (NL)

⑦ PCR premix ITS (ITS)

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1) 検出成績

8 地衛研評価機関の測定結果を表 2 に示す。全ての地衛研において **blind samples** について同定することが出来た。また、シーケンス結果の一例を示す(表 4)。

2) 検査測定評価

各地衛研から下記の項目について提出された。

(1) PCR について

以下についての総評が提出された。

- ・送付された PCRpremix 試薬で PCR を実施するとバンドがスメア状になってしまうので Primer 濃度を 25 μ M まで希釈して実施したが未だ濃い様でした。
- ・NC で PC や Sample と同じ付近にバンドが確認されたことや Sample1 で ITS 領域のバンドが約 800bp 位に現れたことから、領域や PCR 条件等を検討する必要があるのではないかと(図 1—3)。
- ・NC においても増幅バンドがみられた。
- ・今回の方法は、真菌をユニバーサルに

検出できる系と思われるが、それについての説明（どのような菌種が検出可能かなど）をマニュアルに記載してもらえると分かりやすくなる。

- ・ Blast の結果、*Candida* 属では D1/D2 LSU 領域だけでも同定が可能であること、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus* 属では領域をさらに増やし解析する必要があるのではないか。
- ・ 改良 PCR 法の条件も提言された(表 3)。

(2) シークエンスについて

- ・ *A. fumigatus* については variety など近縁種と配列が同じなので、 β -tubulin 遺伝子によるシークエンスが必要である。

(3) その他

- ・ 真菌同定検査法の確立は、バイオテロ対策のみならず、食品苦情事例にも非常に有用であると感じました。
- ・ 真菌を培養した場合の実験室のコンタミのリスクを考えると やはり PCR→シークエンスというのが主流なのか。
- ・ 検査自体はとても順調に進みました。

D. 考察

バイオテロに用いられる可能性の高い重要疾患として、アメリカ CDC はカテゴリーA, B, C 分類を行い、それぞれ A:6 疾患、B:12 疾患、C:5 疾患(2003)を設けている。その中で、特に高い死亡率、感染力等をもつカテゴリーAには、天然痘、炭疽、ペスト、ポツリヌス中毒、それに各種のウイルス性出血熱が含まれている。これらのカテゴリーA 対象微生物は、昨年度までの本班の研究で今回同様に、国立感染症研究所で作製されたバイオテロ対象病原

体の網羅的測定キットを用いて地衛研で測定評価を行った。ブラインドサンプルとして与えられた *Candida albicans*、*Aspergillus fumigates*、*Cryptococcus neoformans* は 8 地衛研で同定することが出来た。しかし、バイオテロに使用される可能性の極めて高いコクシジオイデス、ヒストプラスミン、トリコセテン・マイコトキシンなどの真菌類を対象にした検査体制の構築は必須で、次年度の計画の中に含まれている。

地衛研では、細菌やウイルスに対する検査・同定技術は優れているが、多くでは真菌類の検査を施行している機関は少ない。真菌検査に馴染めていないのが大きな理由である。今年度は、先ず最初に真菌類検出能力を、一般的によく知られている真菌類をもちいた網羅的検出について、評価したが、サンプルの正確な同定が得られた。くわえて、課題と要望も同時に回答があり、今後の検査に前向きであることが窺えた。

今後は、バイオテロ発生の際には、これらの研究協力地衛研が核となり、技術的指導の研修並びに情報連携のネットワーク構築のセンターになることを目指して意識を高めることを望んでいる。

E. 結論

バイオテロ対象病原体の一つである真菌の網羅的測定キットを用いて地衛研で測定評価を行った。その結果、研究協力の 8 地衛研では、ブラインドサンプル、*Candida albicans*、*Aspergillus fumigates*、*Cryptococcus neoformans* を特定することが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Hideki Hasegawa, Toshio Kumasaka, Satoru Hata, Shinya Tanaka, Tomonori Amano, Takahiko Kasai, Ja-Mun Chong, Toshihiko Iiduka, Iwao Nakazato, Yohko Hino, Akihiko Hamamatsu, Hisashi Horiguchi, Tomoyuki Tanaka, Akio Hasagawa, Yoshiaki Kanaya, Reiko Oku, Takeshi Oya and Tetsytaro Sata. Histopathological and

immunohistological findings of 20 cases with 2009 H1N1 virus infection. Modern Path. (2011), 1-13

2. 学会発表

なし

今後の課題

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

表 1. 共同プロトコール

1. 真菌同定

遺伝学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう。標準株の遺伝子を対照として、rRNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS)領域、または rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit)を増幅するプライマーにて PCR を行い、増幅産物が得られた場合には、この産物についてシーケンスを行ったのち、国際的に公表されているデータベースを参照して菌種を同定する。

1) DNA の抽出

精製したサンプル DNA を送付。

2) PCR

1)で抽出した DNA を template にして、D1/D2 LSU および ITS 領域を増幅する。

● D1/D2 primer

NL1	5- gca tat caa taa gcg gag gaa aag-3
NL4	5- ggt ccg tgt ttc aag acg g-3

● ITS primer

ITS1	5- tcc gta ggt gaa cct gcg g -3
ITS4	5- tcc tcc gct tat tga tat gc -3

● サイクル

温度	時間	サイクル数
98°C	5 min	-
95°C	1 min	40 cycles
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	-

3) ホモロジー検索と判定

国際的に公表されているデータベースである BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を参照して、99%以上の相同性を基準として、菌種を同定する。99%以上の相同性が得られない場合、再度同定を試み検索する。再同定でも同定できない場合は可能性の高い上位菌種を列挙し、参考結果とする。またアスペルギルス属に関しては上記以外に β -tubulin 遺伝子、クリプトコックス属に関しては IGS 領域の塩基配列まで決定し、同定することがある。

●送付サンプル・試薬一覧（括弧内はチューブラベル表記）

<2ml スクリューキャップチューブ 7 本>

- ・ Positive control (PC); *Candida albicans* genome DNA
- ・ Negative control (NC); *Klebsiella pneumoniae* genome DNA
- ・ blind DNA sample 1 (1)
- ・ blind DNA sample 2 (2)
- ・ blind DNA sample 3 (3)
- ・ PCR premix NL (NL)
- ・ PCR premix ITS (ITS)

<1.5ml スクリューキャップチューブ 5 本>

- ・ TAKARA Ex Taq (Ex)
- ・ 100 μ M NL1 primer (NL1)
- ・ 100 μ M NL4 primer (NL4)
- ・ 100 μ M ITS1 primer (ITS1)
- ・ 100 μ M ITS4 primer (ITS4)

●PCR 反応液組成（1 サンプル分）

Template DNA	5
10xBuffer	5
2.5mM dNTP	4
50 μ M primer	2 (1 μ l each)
H ₂ O	33.75
Ex Taq	0.25
Total	50

(μ l)

※酵素と鋳型 DNA 以外を混合し premix とした

●PC, NC, 1, 2, 3 の DNA サンプルと no template control の計 6 サンプルで実験を行う

●PCR 反応液調製例（6 サンプル分）

PCR premix (NL or ITS)	268.5
Ex Taq	1.5
Total	270

(μ l)

-45 μ l ずつ PCR 反応チューブに分注

-5 μ l の鋳型 DNA を添加

-転倒混和し、PCR 反応へ

温度	時間	サイクル数
98°C	5 min	-
95°C	1 min	40 cycles
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	-
4°C		

●PCR 増幅の確認 (ITS、NL ともに約 500 bp)、PCR 産物の精製、シーケンスに関しては各研究機関の実験方法でお願いします。ITS 領域の PCR 断片については ITS1 および ITS4 で、D1/D2 LSU 領域 (NL) については NL1 および NL4 でそれぞれシーケンスを行い、配列決定を行ってください。

表2 地方衛生研究所 測定結果

地衛研名	Sample		
	1	2	3
A	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>Filobasidiella neoformans</i>
B	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i>
C	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
D	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>
E	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>
F	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
G	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
H	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>

PCR

送付されたPCR premixを使用し、添付書に従って実施したところ、一部バンドが不明瞭となったため下記方法によって実施した。

●PCR反応液組成（1サンプル分）

10× Ex Taq Buffer	5.0μL
dNTP mixture (2.5mM)	4.0μL
Primer NL1 or ITS1 (25mM)	1.0μL
Primer NL4 or ITS4 (25mM)	1.0μL
Ex Taq	0.25μL
DW	36.25μL
Total	47.5μL

反応液47.5μLとサンプル2.5μLをチューブに分注

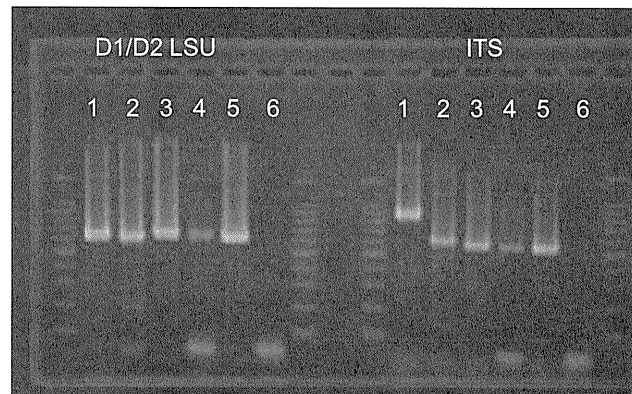
表 3. 改良 PCR 法 (提言)

泳動条件・結果

Agarose : 2% NuSieve3:1

マーカー : 100bpラダー

PCR産物10μLとローディングBuffer2μLを混和し10μLずつアプライ



1 DNA Sample 1 3 DNA Sample 3 5 PC
2 DNA Sample 2 4 NC 6 No Template Control

- D1/D2 LSU領域、ITS領域ともにSample1を除き600bp付近にバンドを確認した。
- Sample1についてはITS領域でのバンドを800~900bpに確認した。
- NCでSample、PCと同付近に薄いバンドを確認した。

図 1. PCR 法の実例①

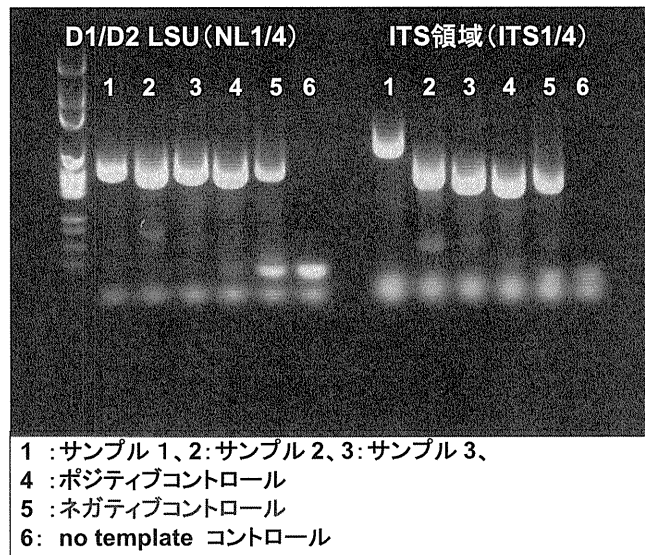
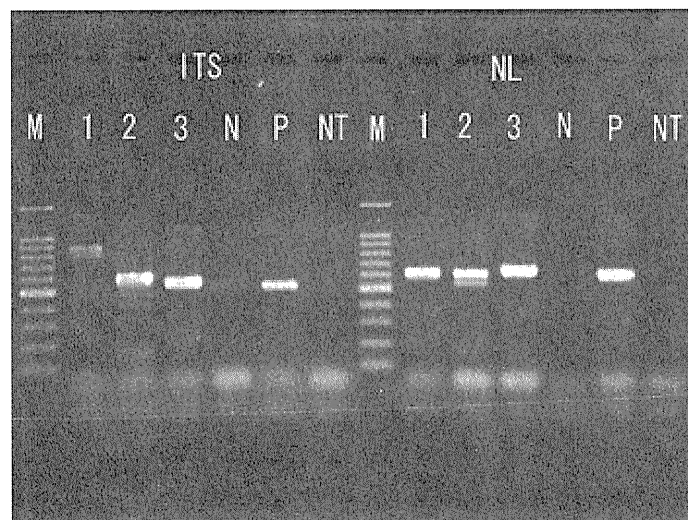


図 2. PCR 法の実例②

PCR増幅の確認



M : DNAサイズマーカー、
 1 : サンプル1、2: サンプル2、3: サンプル3、
 N : ネガティブコントロール
 P : ポジティブコントロール
 NT: no templateコントロール

図 3. PCR 法の実例③

表 4 シークエンス結果 (実例)

ア Sample 1 NL1/ NL4

GGAGGAAAAGAAACCAACTGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTT
GAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGTACCACTTTGGGACTGTACTTTGCC
TATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGGTGTCAAGTTCTTT
GTAAAGGGTGCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATC
TAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGT
TTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTG
TTTTGCGCCCCCTTGCTCTCGTGGGCTTGGGACTCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCGGTTTTG
GCGGCCGAAAAAACCTAGGGAATGTGGCTCTGCGCCTCGGTGTAGAGTGTATAGCCCTGGGGA
ATACGGCCAGTCGGGACCGAGGACTGCGAT

イ Sample 1 ITS1/ ITS4

GTCTGAGCTCGGAGAGAGACATCTCTGGGGAGGACCAGTGTAGACACTCAGGAGGCTCCTAAAAT
ATTTTCTCTGCTGTGAATGCTATTTCTCCTGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTTGGTGGGTGTTCTGC
AGTGGGGGGAGGGAGCCGACAAAGACCTGGGAGTGTGCGTGGATCTCTCTATTCCAAAGGAGGT
GTTTTATCACACGACTCGACACTTTCTAATTACTACACACAGTGGAGTTTACTTTACTACTATTCTT
TTGTTTCGTTGGGGGAACGCTCTCTTTTCGGGGGGGAGTTCTCCAGTGGATGCAAACACAAACAAA
TATTTTTTTAAACTAATTCAGTCAACACAAGATTTCTTTTAGTAGAAAACAACCTCAAACCTTTCAA
CAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGGGGCATGCC
TGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACACATTGTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCG

ウ Sample 2 NL1/ NL4

GCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAA
TTTGAAAGCTGGCCCCCTTCGGGGTCCGCGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCAGCCCC
GTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCTGC
GTCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAAT
TTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAA
AGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTTCGACCAGAC
TCGCCCCGCGGGTTTCAGCCGGCATTTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGT
TTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGTATCACCTCTCGGGGTGTCTTATAGCCGAGGGTGC
AATGCGCCTGCCTGGACCGAGGAACGCGCT

エ Sample 2 ITS1/ ITS4

GGTCACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGTTTTCGACGGCCGC
CGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAA
AGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC
CCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCA
GCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGGCC
GGCGCCAGCCGACACCCAACCTTATTTTTCTAAGGTTGACC

オ Sample 3 NL1/ NL4

GAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGTGAACCGGGAAGAGCTCAAATTTG
AAATCTGGCGTCCTCCGGGCGTCCGAGTTGTAATCTACAGAAACGTTTTCCGTGCTGGACCGTGT
CTAAGTCCCTTGGAATAGGGTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTACTTGACACGATCACCAGTGC
TCTGTGATACGTTTTCTACGAGTCGCGTTACTTGGGAGTGTAGCGCAAAATGGGTGGTAAACTCCA
TCTAAAGCTAAATATTGGTGGAAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCA
CTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGTGT
CTATTGGGTTACGCCAGTTCTGCTGGTGTATTCCCTTTAGACGGGTCAACATCAGTTCTGATCGGT
GGATAAGGGCTGGGGGAATGTAGCACTCTTCGGAGTGTGTTATAGCCTCCTGTGCGATACACTGG
TTGGGACTGAGGAATGCAGCTCGCCTTATGGCCGGGTTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGGATGTT
GACAAAATGGCTTTAAACGACCCGTC

カ Sample 3 ITS1/ ITS4

ACCTGCGGAAGGATCAGTAGAGAATATTGGACTTCGGTCCATTTATCTACCCATCTACACCTGTGA
ACTGTTTATGTGCTTCGGCACGTTTTACACAAACTTCTAAATGTAATGAATGTAATCTTATTATAAC
AATAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGCTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGCGCCCTTTGGT
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGGAGAGTCATGAAAATCTCAATCCCTCGGGTTTTATTACCTGTTG
GACTTGGATTTGGGTGTTTGGCGGACCTGCAAAGGACGTCGGCTCGCCTTAAATGTGTTAGTGG
GAAGGTGATTACCTGTCAGCCCGGCGTAATAAGTTTTGCTGGGCCTATGGGGTAGTCTTCGGCTT
GCTGATAACAACCATCTCTTTTTGTTTGACCTCA