

学位論文題名

病原微生物の迅速検知

－フィロウイルス及び炭疽菌に関する検討－

学位論文内容の要旨

【序論】 感染症の発生が疑われる場合、病原微生物の検出および同定は感染症対策上第一に求められる。特に病原性、感染性の高い細菌やウイルスを原因とする感染症は、対策の遅れが感染拡大に繋がるため、早期での病原微生物の検知が必要であり、臨床現場でも使用可能な迅速かつ簡便な検出法を開発することが必要とされている。本研究では、新興感染症の中でも特に病原性、感染性が高くアフリカ地域において集団感染が増加傾向にあるエボラウイルス (EBOV) とマールブルグウイルス (MARV) (ともにフィロウイルス科)、および病原性が高く、生物テロへの使用も危惧されている炭疽菌の迅速検知法の開発を行った。検知技術として、等温遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法に着目した。LAMP 法は、①増幅効率が非常に高く、②RNA を鋳型に用いた場合でも、逆転写反応から cDNA 増幅までワンステップかつ一定温度で反応を進行させることができ、③反応副産物 (ピロリン酸マグネシウム) による反応液の濁度を指標としたリアルタイム検出及び蛍光剤添加による目視検出が可能である。したがって、LAMP 法は迅速性、簡易性に優れた遺伝子増幅法であり、臨床現場での迅速な微生物検査法としての応用が期待できる。そこで、LAMP 法を応用したフィロウイルス及び炭疽菌の迅速遺伝子検知法の開発を行った。

【結果及び考察】

1) エボラウイルス EBOV にはヒトに対して病原性を示す *Zaire*、*Sudan*、*Ivory Coast* 及びヒト非病原性の *Reston* の計 4 種が分類されている。今回、発生件数が最も多く、ヒトに対する病原性が最も高い *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) について RT(reverse transcription)-LAMP 法によるウイルス遺伝子検出法の開発を試みた。EBOV の配列比較から 5' 端非転写領域である trailer 配列を増幅標的とし、プライマーを設計した。プライマーの性能評価は、*in vitro* 転写にて調製したウイルスタンパク質のコード領域を持たない人工 RNA (minigenome) を鋳型に用いて行った。その結果、検出感度は 1 反応あたり 20 コピーであり、反応液の濁度を指標としたリアルタイム検出では、 $2 \times 10^1 - 10^6$ コピーの鋳型を用いた場合、15-25 分程度で LAMP 陽性が確認された。また、感染性ウイルス粒子を用いた検討から、ZEBOV 株特異的であること、感染価 10^3 FFU に相当するウイルス RNA 抽出液から検出可能であることを確認した。以上の結果から、RT-LAMP 法による ZEBOV 検出法は特異性、検出感度に優れたウイルス検出法であることが示された。EBOV 感染者は数日で高度のウイルス血症を起こす。既存の RT-PCR 法と同等の感度が

得られたことから、RT-LAMP による ZEBOV 検出法は臨床検査法としても有用だと考えられた。

2) マールブルグウイルス MARV は *Lake Victoria marburgvirus* の 1 種のみ分類されている。過去の分離株のゲノム配列に基づく系統解析から、大きく 2 つの系統 (Musoke、Ravn 系統) に分岐しており、系統間の配列は互いに 20% 程度の相違があることが明らかにされている。そのため既存の RT-PCR 法においても全ての分離株を検出できない場合が多い。そこで、ウイルス株間の配列保存性から NP 遺伝子を増幅標的とし、Musoke 及び Ravn 系統それぞれに対し系統特異的なプライマーの設計を行った。各プライマーを用いた RT-LAMP 法により、系統特異的にウイルス株が検出されることを確認し、さらにマルチプレックス化により両系統に属するウイルス株を検出できることを確認した。ウイルス RNA を用い、TaqMan RT-PCR による検出法との感度比較を行ったところ、RT-LAMP 法は TaqMan RT-PCR 法と同等もしくはそれ以上の検出感度を得ることが示された。また、RT-LAMP による MARV 検出法の有用性を評価するため、2004-05 年アンゴラでの発生例で得られた臨床検体からの MARV 遺伝子の検出を試みた。その結果、電気泳動検出及び蛍光目視検出においても、RT-PCR 陽性 18 検体中 14 検体が RT-LAMP 陽性であり、ウイルス感染価 10^4 TCID₅₀/ml 以上の検体からの検出が可能であった。以上の結果から、今回開発した RT-LAMP による MARV 遺伝子の検出法は、検出特異性、感度に優れ、臨床検体からのウイルス検査法としても有用であると考えられた。

3) 炭疽菌 炭疽菌については、染色体上の S-layer 構成タンパク質遺伝子 *sap*、及び 2 つの病原性プラスミド pXO1 と pXO2 上の遺伝子 *pag* (防御抗原遺伝子)、*cap* (莢膜関連遺伝子) の計 3 つの炭疽菌特異的遺伝子を標的とし、LAMP プライマーを設計した。各プライマーを用いた LAMP 法により、炭疽菌株を特異的に検出できること、炭疽菌と近縁の *B. cereus*、*B. thuringiensis* 及びその他バチルス属菌種と交差反応しないことを確認した。また 2 つの病原性プラスミドの有無の結果から、検出された炭疽菌株の病原性の推定が可能と考えられた。検出感度は DNA 量にして 10 fg (3.7 細胞相当) であり、既存の PCR と比較し 10-100 倍以上の感度を得た。以上の結果から、今回開発した LAMP 法による炭疽菌検知は、特異的かつ高感度な方法であることが示された。また、BALB/c マウスを用いた吸入炭疽モデルを作出し、血中炭疽菌の簡易検出法として LAMP 法の有用性を検討した。炭疽菌芽胞を経鼻接種したマウスから血液を採取し、これをサンプルとして検討を行った。血液からの抽出法は操作が簡易なボイル法を採用し、抽出サンプルから LAMP 法及び PCR 法にて炭疽菌遺伝子の検出を試みた。LAMP 法による検出では、ボイル法にて抽出したサンプルを用いた場合でもカラム精製法と同等の検出感度を得ることができ、 7.2×10^3 CFU/ml の血液からの検出が可能であった。また LAMP 法は PCR 法と比較し、血中炭疽菌をより高感度に検出することができた。このことから、操作が容易なボイル法と LAMP 検出の組み合わせにより、血液試料から迅速かつ簡便に炭疽菌検出を行うことができると考えられた。炭疽菌感染による病態のうち最も重篤化するのは吸入炭疽であり、症状が急速に進行するため、迅速な炭疽菌感染の同定を必要とする。今回ボイル抽出と LAMP 法の組み合わせにより、血中炭疽菌の迅速かつ簡易な検出として有用であることが示されたことから、臨床現場での炭疽菌検出としての有用であると考えられた。

【総括】 LAMP 法は増幅判定の簡便性、迅速性という特徴を有す。今回の検討から、フィロウイルス及び炭疽菌の検出法として特異性が高く検出感度に優れた方法であること、また臨床

検体または動物感染モデルから標的遺伝子を検出することが可能であることが示された。したがって、LAMP 法による検出法は、臨床現場での迅速かつ高精度なスクリーニング法として有用であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 茂 直 樹

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 松 本 健 一

副 査 室 長 安 田 二 朗 (科学警察研究所)

学 位 論 文 題 名

病原微生物の迅速検知

－フィロウイルス及び炭疽菌に関する検討－

感染症の発生が疑われた場合、第一に求められることは起因菌およびウイルスの検出同定である。症例数の多い市中感染症については、分離株数も多く、ゲノム情報も蓄積されているため、病原微生物の検出法に関する研究は大きく進展している。しかし、症例数が少ない感染症については、病原菌自体の情報が限られており、検知技術の開発が十分なされていない場合が多い。特に新興・再興感染症は症例数こそ少ないものの、原因となる病原体の病原性、感染性が高く、有効な薬剤やワクチンがない場合が多いため、一度発生すると広範な感染症の伝播が起こる可能性が高い。従って、このような病原体に対して迅速な検知技術を開発することは公衆衛生上重要である。また、昨今の社会情勢を背景に、生物テロの発生が危惧されており、炭疽菌や天然痘ウイルス等がテロに使用される可能性が指摘されている。このような病原菌について検知技術を開発することは、公衆衛生面だけでなく社会的にも意義が深い。そこで、本研究では、新興感染症の中で病原性、感染性が高いエボラウイルスとマールブルグウイルス、および生物テロに使用される可能性が最も高いとされている炭疽菌について、迅速検知法の開発を目的としている。

病原菌の DNA を見知する方法として、PCR 法、蛍光プローブまたはインターカレーターを用いたリアルタイム PCR 法がある。しかし、これらはサーマルサイクラー等の高精度かつ高価な機器を必要とし、増幅および鑑定にも時間を要するため、「その場検知」には不向きである。そこで、申請者は簡易性・迅速性に優れた LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification 法) を採用している。この方法は、サーマルサ

イクラは不要であり、普通の恒温槽でよい。また、増幅反応が進行すると多量の不溶性副産物であるピロリン酸マグネシウムが生じ、反応液の濁度を指標に肉眼でも増幅の有無を判定できるし、カルセインを反応液に添加すると、紫外線照射でより明確に肉眼での増幅判定が可能になるなどの、「その場鑑定」に適している。

本論文は和文で書かれており、4つの章からなる。第1章は序論であり、研究の必要性および LAMP 法の解説がなされている。第2章は実験材料および方法である。これらのことに関して、詳細な記述をしている。第3章は、結果および考察である。申請者が扱った2種のウイルス（エボラウイルス、マールブルグウイルス）および炭疽菌について、それぞれ1つの節を設けて、記述されている。第4章は総括である。

エボラウイルスについては、感染対策上最も優先度の高いザイールエボラウイルスについて検出法を開発している。リアルタイム検出において15-30分で結果を得ることが出来、迅速性に優れた方法である。ザイールエボラウイルスに特異的であるとの結果も得ている。感度は、PCR法と同程度であるが、「その場検知法」として優れていた。

マールブルグウイルスに対して特異性の高い方法を開発している。この方法は PCR 法よりも感度が高かった。しかし、2004—2005 年にアンゴラで流行した際に、採取された感染血液を用いて、採血時に PCR 法で測定された値との比較を行ったが、実験室レベルでは PCR に優るものの、この臨床サンプルでは採血時に PCR 法で得られた陽性率と同等の値を得ることは出来なかった。血液は凍結保存されており、このためであろうと推定している。

炭疽菌についても特異性の高い方法を開発している。炭疽菌と近縁菌種である *B. cereus* および *B. thuringiensis* には交差反応が認められなかった。また、吸入炭疽発症者から迅速かつ簡易に炭疽菌を検出する方法を確立することを目的に、炭疽菌芽胞を経鼻接種した感染動物モデルを作り、血液からの炭疽菌検出法を確立している。

このように、申請者は、新興感染症の中で病原性、感染性が高いエボラウイルスとマールブルグウイルス、および生物テロに使用される可能性が最も高いとされている炭疽菌の迅速検知法の開発に成功し、また、それが、感染患者の発生している現場での陽性の検定が可能であり、実用になることを示している。この研究業績に対して、博士（薬学）を授与するに十分であると判定した。