

峻厳マイクロプレートハイブリダイゼーション法による エンテロウイルスの遺伝子診断と分子疫学

大腸菌 DNAポリメラーゼを用いた PCR法が1985年にKary Mullis によって報告され、1988年には耐熱性の Taq DNAポリメラーゼを用いる方法が報告されて以来 PCR法は急速に発展して、様々な分野で使用されるようになった。

とりわけウイルス学の分野においては、反応の迅速性、検出感度の高さ、操作の簡便さといった理由から、あらゆるウイルスの一般的な検査法となった。PCR 法はさらに、遺伝子中の特定の配列が増幅して手に入れられるといった事から DNA診断、分子疫学といった新しい分野の調査、研究を飛躍的に進歩させた。

DNA 診断や分子疫学等には遺伝子の配列を決定するのが一番確実であるが、配列決定には操作に手間がかかり、解析も容易ではない。そこで大量のサンプルを一度に比較できる方法として制限酵素切断パターン法 (Restriction Fragment Length Polymorphism Assay) 法とハイブリダイゼーション法等が用いられる。

前者は遺伝子の変異を制限酵素の切断パターンの違いによって検出する方法である。制限酵素は DNAの中の特異的な配列を認識して遺伝子を切断する酵素で、PCR 増幅 DNAに特異的な配列があれば DNAを切断するが、その部分に変異が起きると切断出来なくなる。

実際には数種類の制限酵素を使用して、各制限酵素による切断パターンにより細かく分類し、ウイルスの性状や感染経路の追求が出来る。しかし、各グループ間の近縁関係は解らない。

後者は特定の遺伝子配列を持つプローブとの相補性によって分類する方法である。サンプルを固定し、標識したプローブ (一定の遺伝子配列の探子) と反応させ、二重鎖を形成出来るか否かによってプローブと同一の遺伝子配列を持つか否かを判定する。従来はプローブの標識に放射線が用いられていたが、PCR によって遺伝子を増幅して試験が出来るために、感度の低い非放射線標識プローブでも検出可能となり、取り扱いが容易になった。

二重鎖は配列が完全に相補的でなくても形成されるが、その程度は反応時あるいは洗浄時の温度を変えることによって変化する。即ち低い温度で反応させると配列があ

る程度違っていても二重鎖を形成するが、温度を高温にすると一致率の高いものでなければ二重鎖を形成し得なくなる。即ち高温でハイブリダイズされるものほど近縁関係にある事が解る。

ウイルスの遺伝子配列は子孫に引き継がれていくので、あるプローブとハイブリダイズするウイルスとハイブリダイズされないウイルスとでは祖先が違う、即ち感染経路が違う事を意味している。また遺伝子は絶えず変異し続けているが、温度を変えてハイブリダイゼーションを行う事によってある程度の変異ならば追跡できる。

本藤と井上はハイブリダイゼーションに ELISA用プレートを使用することで DNA固定の簡便化と定量化をはかった (Inouye S, Hondo R. J Clin Microbiol 28, 1990)。

我々は PCR法を使ってエンテロウイルスの遺伝子を増幅し、本藤・井上の方法を応用して、峻厳な条件下でのハイブリダイゼーションによって、ポリオウイルス野生株感染の有無、エンテロウイルス遺伝子型別による分子疫学を行う峻厳マイクロプレートハイブリダイゼーション (Stringent Microplate Hybridization 以下 SMH法と略) 法を開発した。

この方法の特徴は使用したプローブとハイブリダイズするサンプルの遺伝子配列の一致率を温度を変えることによってコントロールできる事にある。我々はハイブリダイズの温度を50℃にして血清型別を行い、56℃で更に細かい遺伝子型別を行った。

この方法は他の病原体等に幅広く応用可能である。以下にエンテロウイルスの PCRとハイブリダイゼーションの方法を紹介する。

1. PCR法

エンテロウイルスは全部で68種類の血清型があるが、その各々に対してプライマーを設計する事は実用的ではない。幸いなことに、5' ノンコーディング領域付近にはエンテロウイルスに共通な配列部分がいくつか存在しており、この部分にプライマーを設計すればほとんどのエンテロウイルスが増殖可能である。

我々が目的とする分子疫学のために PCRを行うには比

較的変異に富んだ部分を挟んで両端に目的とするウイルス間では共通の配列がある部分を用いるのが望ましい。両端の共通部分をプライマーとして遺伝子を増幅し、変異に富んだ部分を用いて分類を行うのである。

エンテロウイルス遺伝子の増幅には以下のプライマーを用いる。

ダウストリームプライマー (OL68-1)
5' -GGTAA[C/T]TCCACCACCACCA[A/C/G/T]CC-3'

[]内はミックスである。

アップストリームプライマー (EVP4)
5' -CTACTTTGGGTGTCGGTGT-3'

このプローブはエンテロウイルスの内部構造蛋白であるVP 4 と外部構造蛋白であるVP 2 の約 1/3を認識する遺伝子部分で、約 650塩基を増幅することが出来る。

エンテロウイルスの PCRを行うためには25cm³の培養瓶 1 本分ほどのウイルスがあれば充分である。

1) ウイルス RNAの抽出。

RNA の抽出はウイルス液とフェノール・クロロフォルムとを等量混合し、攪拌後遠心して水層を取る。抽出した RNAは99%エタノールによって析出し、遠心沈殿によって集められる。RNA は非常に壊れやすいのでゴム手袋をするなど注意をして取り扱う。

2) cDNAの作成。

エンテロウイルスの遺伝子は一本鎖の RNAである。PCRを行うにはウイルス RNAから逆転写酵素によって相補的な DNA(cDNA)を作らねばならない。エンテロウイルスRNAはメッセンジャー RNAと同じように3' 末端にアデニンがいくつも連なっている(ポリAと呼ぶ)ので、cDNAの作成にはチミジンが連なったオリゴdT₍₁₂₋₁₈₎ (市販品)をプライマーとして使用する。

3) PCR

著者らの方法ではサンプルとプローブの作製に PCRを用いる。プローブはサンプルと全く同じプライマーを用い、同じ長さで作成する。プローブの作製にはビオチン-11-dUTPを加え、ハイブリダイズ後のプローブの検出に用いる。他はサンプルの PCRと同様である。

PCR の条件は94℃ 4分反応後、94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を35回繰り返し、最後に72℃ 4分反応させる。この間の時間は約 4時間で終了する。

4) PCR 産物(サンプル、プローブ)の精製。

PCR によって大量に増幅した DNAが実験室内に放出され、コンタミネーションによる偽陽性が起きる可能性があるため、以後の作業は PCRの調整とは別の部屋で行うのが望ましい。

サンプル、プローブの精製はウイルス RNAの抽出と同

じである。

2. SMH 法

1) サンプルの固相化 図の a)

SMH 法には ELISA用のマイクロプレートを用いる。サンプルの固相化は非常に簡単で、煮沸後一定濃度の DNAを1.5M NaCl溶液に溶かして、プレートに分注し、37℃ 2時間あるいは室温に一夜置くだけで固定される。

2) ハイブリダイゼーション 図の b)

ハイブリダイゼーションの反応は温度によって異なった結果が得られる。即ち、大きなグループに分類する場合は遺伝子配列が比較的異なったものも二重鎖が形成されるように低い温度で反応させ、細かく分類する場合は遺伝子配列の一致率が高いもののみ二重鎖が形成される高い温度で反応させる。

3) 洗浄 図の c)

ハイブリダイゼーションは一夜反応させた後、二重鎖を形成しなかったプローブを洗浄、除去する。

4) ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン添加 図の d)

プローブに取り込まれたdUTPに結合しているビオチンに、ビオチンと特異的に結合するアビジンを反応させる。このアビジンには後の発色反応の触媒となる酵素、ペルオキシダーゼが共有結合したもの(市販品)を用いる。

5) 洗浄 図の e)

余分なペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを洗浄、除去する。

6) プローブの発色 図の f)

ストレプトアビジンに結合したペルオキシダーゼ酵素によってオルトフェニレンジアミンを褐色に発色させる。この反応は ELISA用の分光光度計を用いて、吸光度として定量可能である。

以上の方法により、エンテロウイルスの血清型別と、人から分離されたポリオウイルスの遺伝子型別を行った。結果は以下の通りであった。

エンテロウイルスの SMH法はハイブリダイズの温度を50℃程度にすると血清型別に使用できる。現在までのところ cox.A4、cox.A16、entero71、echoll、echo 30等では最近の分離株をプローブとして使用すれば、約10年程度は血清型別に使用できる。

この方法により、同一グループに属するサンプルの DNA はプローブの配列と80%以上の相同性があった。

プローブが10年程度しか使用できないのは、エンテロウイルスを含むピコルナウイルス群の遺伝子がプラス鎖の一本鎖 RNAであり、遺伝子の修復機能を持たないために比較的変異し易いからである。しかし SMH法で使用する

るプローブは PCRによって簡単に作る事が出来るために、ウイルスの変異に対応して容易にプローブを作り替える事が出来る。

次にハイブリダイズの温度を56°Cに上昇させることにより遺伝子の相違をより細かく検出することが出来た。

我が国で分離される entero71 型ウイルスは2種類あり、愛媛県と愛知県では1983年頃から流行ウイルスが入れ替わっている事や、echo30型ウイルスでは1986年に愛知県で流行したウイルス株はその後に流行したウイルスとはgeno type が違う事等が明らかとなった。

ポリオウイルスにおいてはワクチンに使用されているセービン株と野生株とでは56°Cで反応させると明確に分類できる。

同じ温度の反応によって、パキスタンで分離されたポリオ1型野生株の分類を行うと、2種類に分類できた。またインドで分離された野生株はパキスタンの流行の主流であった遺伝子型の株と同一であった。

PCR、SMH法の意義

PCR法は組織培養に比べて迅速に結果が得られ、診断、治療に役立てることが出来る。

検出感度は 10^7 TCID₅₀～ 10^8 TCID₅₀との報告があり、無菌性髄膜炎の患者からの検出は組織培養と同じ程度と思われる。しかし、髄液からの分離は組織培養より悪いとの報告もある。

PCR法によるウイルス遺伝子の検出は、分離に使用さ

れる細胞、実験動物等の感受性によって左右される事がない為、河川水等の環境中のウイルス検出においてはより実態に近いデータが得られるものと思われる。

SMH法は遺伝子の固相化が簡単で、定量も可能である。またプローブは非放射性マーカの標識がPCRによって簡単に行える等の利点がある。遺伝子の相同性を調べるのに簡便な方法で、幅広く応用可能な技術である。

参考文献

- 1) Inouye S, Hondo R : Microplate hybridization of amplified virus DNA segment. J Clin. Microbiol 28 : 1469- 1472, 1990
- 2) Takeda N, Sakae K, Agboatwalla, Isomura S, Hondo R, Inouye S : Differentiation between wild and vaccine-derived Strains of poliovirus by stringent microplate hybridization of products. J Clin Microbiol 32 : 202-204, 1994
- 3) 石古博昭、成澤忠、北村明子、栄賢司、飯塚節子、甲木和子、松本一郎、武田直和、宮村紀久子、井上栄、山崎修道 : PCR増幅DNAのストリンジェント・リバース固相ハイブリダイゼーションによるエンテロウイルスの型鑑別. 臨床とウイルス 22 : 199-207, 1994
- 4) 栄賢司 : エンテロウイルス検査法, 臨床とウイルス 23 (増刊号) :164-174, 1995

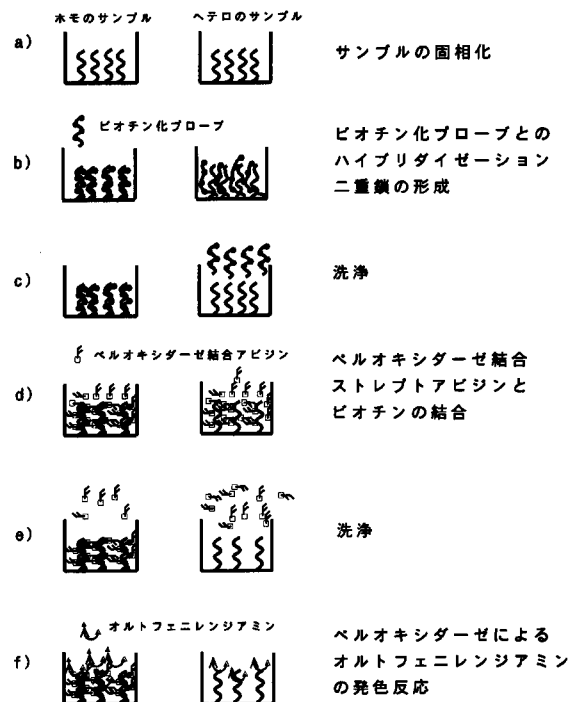


図 ストリンジェント・マイクロプレート・ハイブリダイゼーションの手順

(ウイルス部 栄賢司)

レジオネラ属菌について

1. 歴史

1976年夏、米国フィラデルフィアのホテルで全米在郷軍人会が行われた際、多数の重症肺炎患者が発生した。原因追求の結果、今まで知られていない新しい細菌が検出された。この菌は在郷軍人会(the Legion)での肺炎(pneumonia)にちなんで*Legionella pneumophila*と命名され、病名はLegionnaires' disease(レジオネラ症、在郷軍人病)と呼ばれるようになった。その後の調査により、この菌はこのホテルの冷却塔の水を汚染し、何らかの原因で空調システムを介して散布され、これを吸い込んだ人達が肺炎を発症したものとされた。ホテル利用者及びホテル周辺の通行人の221人が発病し、このうち34人が死亡した。ホテル従業員は何年間も少しずつこの菌に暴露されていたため、免疫ができたのか1人も発症しなかった。このホテルでは前年の夏にも原因不明の肺炎患者が発生していた。

この事例を契機に、過去の原因不明疾患について、患者の病歴と共に系統的に保存されていたその症例の血清、剖検材料、検出された微生物などが検討された。1965年、ワシントンの精神病院で入院患者81人が肺炎に罹患して14人が死亡した。肺炎患者は病院敷地内の掘削現場に近くその風下に面した病棟で多発していた。1968年、ミシガン州ポンティアックの衛生局の建物で、職員及び訪問者144名が熱性疾患(ポンティアック熱)に罹ったが、死者はなかった。故障した空調器の冷却器の水に原因菌のレジオネラ属菌が混入していたことがわかった。1974年、フィラデルフィアのホテルで会議に出席した人の20名が肺炎に罹り2名が死亡した。1968年のポンティアック熱(肺炎に発展せず、症状は比較的軽い)を含め、これらは何れもレジオネラ症であることが後に判明した事例である。以後、レジオネラ属菌による感染症例は米国をはじめ、西欧諸国、オーストラリアなど多くの国で報告され、本症は全世界に存在しているものと思われた。わが国では、厚生省研究班の調査によれば、1979年から1992年までに86名が発病し、26名が死亡している。死者の多くは高齢者や基礎疾患を有する易感染者である。

2. レジオネラ属菌

レジオネラ属菌はグラム陰性の桿菌で、運動性を有する。ぶどう糖をはじめ各種の糖を発酵も酸化もしない。一般的な細菌の分離培地には発育しないため、本菌の分離には発育に必要なL-システインや鉄イオンを含有したBCYE α (Buffered charcoal-yeast extract agar with α -ketoglutarate)培地を用いる。本菌の発育は遅く、

上記培地上で3~10日を要する。発育至適温度は36°C、発育可能温度域は25~43°Cである。60°C以上では死滅する。発育至適pHは6.8~7.0、発育可能なpH域は6.5~7.3とされている。藻類と共生するか、原生動物に寄生するとpH域は拡大し、pH9.1の冷却塔水からも本菌が検出されている。現在では、*L. pneumophila*の血清群は11種に分かれ、*L. pneumophila*以外に22菌種が命名されている。

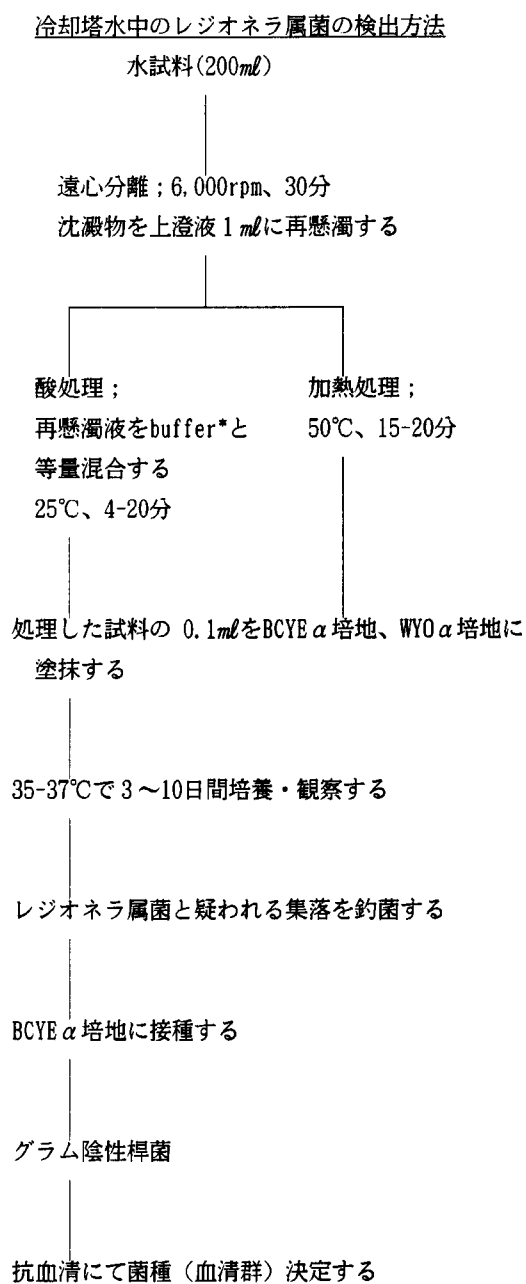
レジオネラ属菌は地球上のいたる所の土壌から分離され、土壌細菌と認識されているが、河川、湖水からも検出されている。また、給湯水、シャワー水、空調器の冷却塔の水といった生活環境からも検出されており、本菌はわれわれの周囲の環境に広く分布していることが確かめられた。

病院内の給湯システムがレジオネラ属菌によって汚染され、シャワーを使った患者にレジオネラ症の発症事例の報告がみられた。危険防止とenergy savingのため、欧米の病院やホテルの温水は温度が低いので、本菌が生息できるものと思われる。そのため、欧米では給水、給湯系からのレジオネラ属菌による感染も問題となっている。わが国のホテルや病院の温水は温度が高いため、本菌による感染事例はみられていない。わが国で、レジオネラ症の感染源として注目されてきているものに温泉水がある。飲酒後に温泉の浴槽内で転倒し、温水を誤嚥しレジオネラ肺炎を発病した事例の報告以来、日本国内の40温泉が調査され、17温泉からレジオネラ属菌が検出された。しかし、ここでは国内外を問わず注目されている冷却塔水のレジオネラ属菌について、昭和63年から当所においても調査を行っているのでその結果を交えて述べたいと思う。

3. 冷却塔水とレジオネラ属菌

土壌中のレジオネラ属菌は粉塵とともに冷却塔に運ばれ、藍藻類や、*Acanthamoeba*のような原生動物と共生して増殖する。レジオネラを含む冷却塔の水は、建物周囲に水滴や小粒子の形でまき散らされ、また吸気口が冷却塔に隣接している場合はそこから室内に吹き出され、これらを吸引してレジオネラ症が発症すると考えられている。感染経路として重要視された冷却塔水における本菌の分布調査は1980年頃から日本各地で行われた。その結果、冷却塔は高率に(50-90%)レジオネラ属菌に汚染されていることが判明した。当所では、特定建築物環境調査の一環として、冷却塔水中のレジオネラ属菌の調査を「病原細菌研究会」の資料に示された方法に準じて行っ

ているが、その方法を以下に示す。



* buffer(pH2.2)
0.2M KCl 25ml+0.2M HCl 3.9ml

以上のとおり、血清型で分類が行われているが本法では*L. pneumophila* 1-6, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*に型別分類されるのみである。さらに詳細にレジオネラ属菌を分類するにはDNA鑑別が実施されている。本県での最近2年間の冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出は延べ36検体中21検体で、検出率は58%であった。また検出された21検体中18検体の菌数は

100ml中 10^3 より少なかったが、3検体は菌数が多く 10^8 以上であった。本調査は同一建築物につき継続して検体採取している場合があるので、建築物を対象とすると、20カ所中14カ所から本菌が検出された（検出率70%）。36検体の冷却塔水の温度は21.0~32.5℃、pHは6.4~9.0であった。本菌が検出された冷却塔水の温度は24.3~32.5℃、pHは6.4~9.0であり、レジオネラ属菌数と温度、pHとは相関なく分布した。同じ冷却塔から本菌がくり返し検出される場合は、冷却塔内部に形成される藻類、微生物の膜や沈澱物が本菌の汚染巣になっている可能性が強く、一度冷却塔水を汚染した菌はそのまま定着すると考えられる。

冷却塔のレジオネラ属菌による汚染防止は重要な課題である。使用する殺菌、殺藻剤が原生動物や藻類の細胞内に浸透するか否かで本菌の除去効果が左右される。また、冷却塔の消毒そのものの有効性を疑問視する報告がみられる。一般健康人が大量のレジオネラに暴露されれば危険であることに間違いはない。従って、汚染された冷却塔水からの本菌の完全除去は困難であるので、冷却塔の消毒、清掃による管理を徹底し菌数を低く保つことがレジオネラ感染症の発生防止に役立つと考えられる。

4. レジオネラ症と臨床

本症発症の第一段階は、レジオネラ属菌が気管支粘膜上皮に付着することである。本菌は好中球やマクロファージなどの食細胞により食菌されるが、活性酸素の産生やphagosome-lysosomeのfusionを抑制するエスケープ機構を有するため殺菌されず、逆に増殖するので細胞内寄生菌と呼ばれている。そのため抗生剤はこれらの細胞に移行するものでなければ有効ではない。エリスロマイシン、リファンピシンはその点で優れた薬剤で、臨床上也有効とされている。肺炎治療によく用いられるペニシリンやセフェム系抗生剤は細胞移行性が悪く無効である。

5. おわりに

レジオネラ属菌について、冷却塔水との関係を中心に述べた。レジオネラ属菌は元来病原性は強くないが、大量に暴露されることは避けなければならない。そのため本菌の十分な調査と水質管理の徹底が重要と思われる。

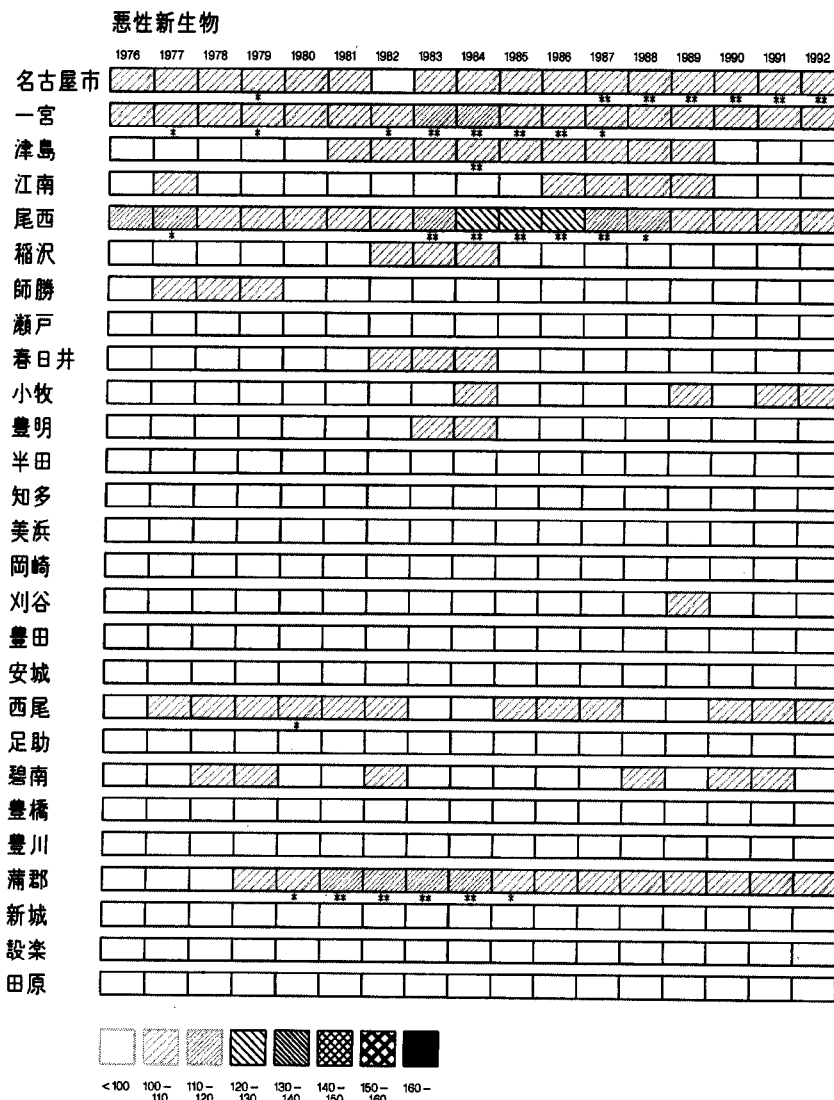
文献

森内 英子：医学細菌学2, pp.365-442, 菜根出版, 1987

(細菌部 荒川 正一)

地域特異性

(2) 悪性新生物のSMRの経年変化



【説明】

昭和47年から平成4年の人口動態調査から、連続する5年間の死亡数及びその間に含まれる国勢調査の性・5歳年齢階級別人口を用いて標準化死亡比を計算した。

これを、その5年間の最後の年の標準化死亡比として表示した。また、全国死亡比との比較には χ^2 検定を用いた。標準化死亡比が100を越える場合には、危険率5%以下を有意とし*、1%以下を**で示した。なお、調査地域の人口に全国の性・5歳年齢階級別死亡率を当てはめて求められる期待死亡数が30人以下となる場合には、ポアソン分布を用いて直接その死亡数以下となる確率を計算し、上記の基準に従って有意差を判定した。

※訂正 技術情報VOL.19 NO.1の「説明」で、「期待死亡率が30人以下の場合にはFisherの精密法を用いた」とありますが、上記の「説明」の4行目後半からの説明のとおりですので、お詫びとともに訂正させていただきます。

(保健情報室)