

# 日本紅斑熱リケッチア検出 Real-timePCR法の改良と 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志 (ウイルス科)

【調査研究】

## 日本紅斑熱リケッチア検出Real-timePCR法の改良と 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

Improvement of the Japanese spotted fever rickettsia detection Real-time PCR method, and training at the prefectural and municipal public health Institutes of the Chugoku-Shikoku region.

木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志 (ウイルス科)

Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Mihoko Isoda, Masako Hamano, Ritsushi Fujii  
(Department of Virology)

### 要 旨

花岡ら (EID,2009) が開発した *Rickettsia japonica* を検出する real-timePCR法の陽性コントロールとして、標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成した。これにより、*R. japonica* 遺伝子の定量が可能となった。また、本法を応用し、遺伝子マーカー配列を probe とすることで、検査と同時に陽性コントロールの検体への混入を確認できる Duplex real-timePCR法を開発し、中国四国地方の地方衛生研究所 8 機関で模擬訓練を実施したところ、全ての機関で良好な結果が得られた。今後、本法の導入を促進し、全国的な検査体制の強化に努めたい。

[キーワード：日本紅斑熱，リケッチア，リアルタイムPCR，TaqMan probe]

[Key words : Japanese spotted fever, Rickettsia, Real-time PCR, TaqMan probe]

### 1 はじめに

日本紅斑熱は感染症法で四類感染症に規定されるダニ媒介性細菌感染症であり、毎年 100 名を超える患者が報告され、治療が遅れると死に至ることもある重篤な熱性発しん性感染症である。本症は、発症後早期に有効な抗菌剤を投与することで重症化を防ぐことができるため、迅速な診断が求められている。2009 年、花岡らによって *R. japonica* を特異的に検出する real-timePCR法が報告され<sup>1)</sup>、導入施設が徐々に増加している。real-timePCR法は、感度・迅速性に優れるなど多くの利点を併せ持つ検査法であるが、反面、陽性コントロールの検体への混入による誤判定の危険性が高いことが知られており、本病原体に限らず、近年の実験室診断の大きな課題となっている。そこで我々は、*R. japonica* 検出 real-timePCR法の標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成し、陽性コントロールとして利用可能か検証した。

### 2 材料と方法

#### 2.1 コントロールプラスミドの作成

*R. japonica* 検出 real-timePCRの標的遺伝子 216bpORFの増幅領域である 85 塩基に、遺伝子マーカー配列 33 塩基を挿入した 118 塩基を合成し(図 1)、PCR法によって増幅した。次に、PCR増幅産物を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社)を用い、添付マニュアルに従って pCR2.1-TOPO vectorにクローニングした。プラスミドに挿入した遺伝子配列を、キット添付の M13 プライマーセットを用いたダイレクトシークエンス法により確認した後、PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)を用い、添付マニュアルに従って組換えプラスミドを精製した。得られた組換えプラスミド溶液の OD 値から、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0) にて  $10^7$ copies/ $2\mu$ L に調製したものをコントロールプラスミド原液とした。

#### 2.2 コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

$10^7 \sim 10^0$ copies/wellとなるよう 10 倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いて検量線を作成し、real-timePCR法における増幅効率及び定量性の検討を

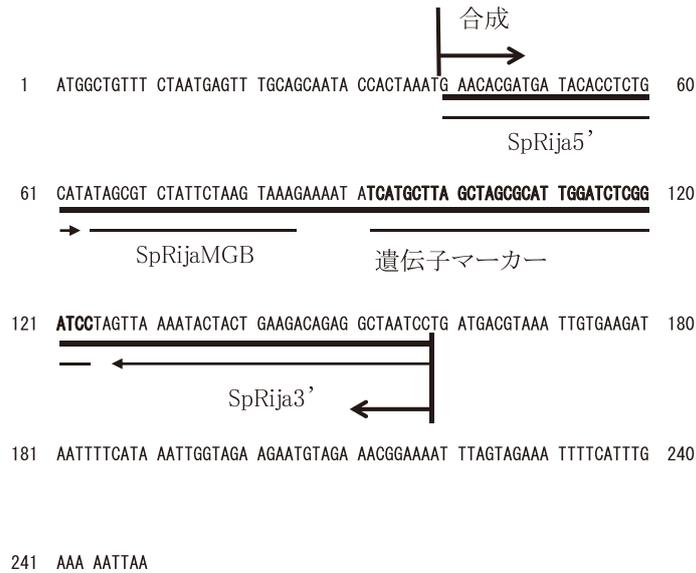


図1 *R. japonica* 検出real-timePCRの増幅領域と遺伝子マーカーの挿入部位

Primerset : SpRija5' , SpRija3' Probe(MGB) : SpRijaMGB

行った。また、遺伝子マーカー配列の挿入による影響を検討するため、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAを $10^{-4}$ まで10倍階段希釈し、増幅効率を比較した。

real-timePCR法は、花岡らの報告をもとに、TaqMan Universal Master mix (life technologies社)を用い、20 $\mu$ L容量(検体2 $\mu$ L)でStepOnePlus (life technologies社)により実施した。プライマー及びプローブの配列を表1に示した。

### 2.3 Duplex real-timePCR法の検討

コントロールプラスミドに挿入した遺伝子マーカー配列を利用し、VIC標識したPC check probeを作成し(表1)、Duplex real-timePCR法によってコントロールプラスミドと*R. japonica* 培養液から抽出したDNAが判別可能か検証した。

Duplex real-timePCR法は、花岡らの方法にPC

check probe(表1)を0.1 $\mu$ Mとなるよう添加し、20 $\mu$ L容量(検体2 $\mu$ L)でStepOnePlusにより実施した。

### 2.4 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

中国四国地方の地方衛生研究所8機関にDuplex real-timePCR法に必要な試薬を模擬訓練実施マニュアルとともに配布し、*R. japonica* から抽出したDNAを検体として、定量値、非特異反応の有無及び使用機器・試薬について報告を求めた。

## 3 結果

### 3.1 コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いてreal-timePCR法を実施したところ、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$  copies/wellの範囲内で、PCRサイクル数に比例した

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列
SpRija5'	24	5'-GAA CAC GAT GAT ACA CCT CTG CA-3'
SpRija3'	32	5'-GAT TAG CCT CTG TCT TCA GTA GTA TTT TAA CT-3'
SpRijaMGB	21	5'-(FAM)-TAG CGT CTA TTC TAA GTA AAG-(NFQ)-(MGB)-3'
PC check probe*	33	5'-(VIC)-TCA TGC TTA GCT AGC GCA TTG GAT CTC GGA TCC -(NFQ)-(MGB)-3'

\* Duplex real-timePCRに使用

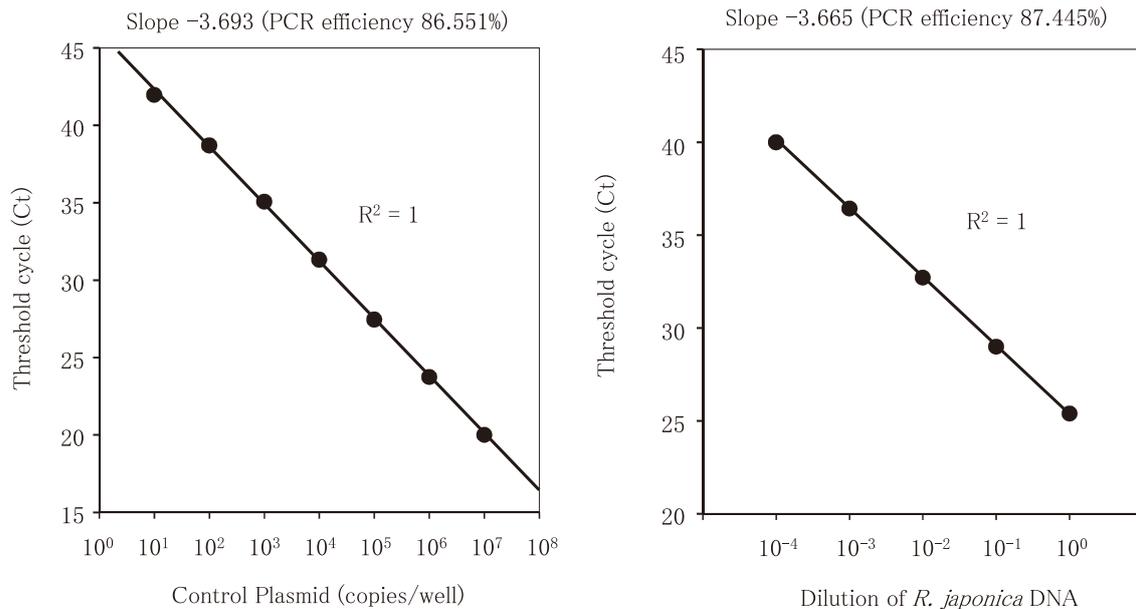


図2 コントロールプラスミドと *R. japonica* 抽出DNAによる real-timePCR 効率の比較

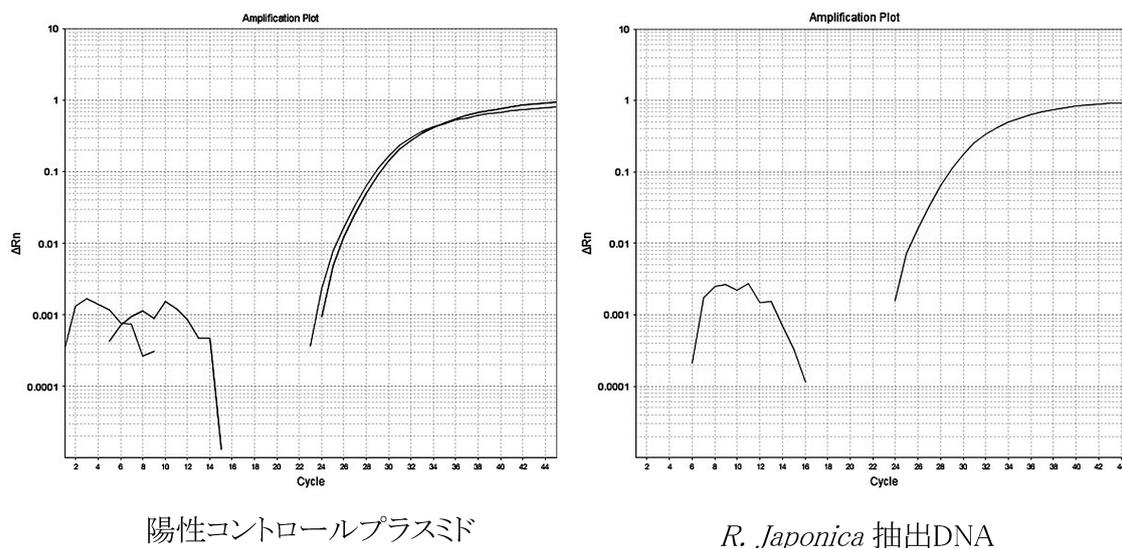


図3 Duplex real-timePCRによる SpRijaMGB probe と P.C. check probe の感度比較

赤:SpRijaMGB (FAM)  
青:PC check probe (VIC)

遺伝子の増幅が認められた。また、X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct) をプロットした検量線を作成したところ、直線性、傾きともに良好であった(図2)。また、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAを10倍階段希釈してreal-timePCR法を実施し、X軸に希釈倍数、Y軸にThreshold cycle (Ct) をプロットしたグラフを作成して解析を行ったところ、コントロールプラスミドと同様の直線性と傾きを示した(図2)。これらのことから、コントロールプラスミドへ

挿入した遺伝子マーカー配列によるPCR増幅効率への影響はなく、定量が可能であることが明らかとなり、その感度は $1 \times 10^1$ copies/wellであると推定された。

### 3.2 Duplex real-timePCR法の検討

Duplex real-timePCR法によって、コントロールプラスミドはFAMとVICの蛍光増幅が確認された。これに対し、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは、FAMの蛍光増幅のみが確認された(図3)。

表2 中国四国地域の地方衛生研究所における模擬訓練

機関	装置	試薬	検体定量値	備考
A	ABI 7500	TaqMan Universal Master Mix	$3.3 \times 10^4$	
B	ABI 7500	TaKaRa Premix EX Taq	$5.1 \times 10^4$ $1.1 \times 10^4$	2名でそれぞれ検査
C	Lightcycler Nano	TaqMan Universal Master Mix	$2.0 \times 10^4$	
D	ABI 7500	TaqMan Universal Master Mix	$1.5 \times 10^4$	
E	ABI 7500 fast	TaqMan Universal Master Mix	$2.2 \times 10^4$	
F	ABI 7500 fast	TaqMan Universal Master Mix	$3.0 \times 10^4$	
G	ABI 7500	Taqman fast advanced master mix	$1.2 \times 10^4$	Cycle条件を変更 95°C3sec 60°C30min
岡山県	ABI StepOnePlus	TaqMan Universal Master Mix	$1.9 \times 10^4$	

### 3.3 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

real-time PCR装置は8機関中6機関がABI 7500（うち2機関でABI 7500fast）、1機関がLightcycler Nano、1機関がABI StepOnePlusを使用していた。また、試薬は8機関中6機関がTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI)、1機関がTaqman fast advanced master mix (ABI)、1機関がPremix EX Taq (TaKaRa)を使用していた。

Duplex real-timePCR法については、8機関全てで正しく実施されており、コントロールプラスミドの検体へのコンタミネーションは認められなかった。また、*R. japonica* 遺伝子の定量値は $1.1 \sim 5.1 \times 10^4$ copies/wellの範囲であった(表2)。

### 4 考察

real-timePCR法は迅速性に優れるだけでなく、電気泳動を必要としないためコンタミネーションのリスクも低い検査法であるが、近年、地方衛生研究所における陽性コントロールのコンタミネーション事例が頻繁に報告されている。これは、人事異動等による技術力の低下も要因の一つであると考えられるが、検査法の改善など、対策は急務である。

今回我々は遺伝子マーカー配列を挿入したコントロールプラスミドを作成し、花岡らの開発した*R. japonica* を特異的に検出するreal-timePCR法<sup>1)</sup>への応を試みた。コントロールプラスミドと*R. japonica*から抽出したDNAを用いたreal-timePCR法によるPCR増幅効率と定量性の検討の結果、両者に明確な違いは観察されず、挿入した遺伝子マーカー配列によるreal-timePCR法への悪影響は無いと考えられた。また、SpRijaMGB (FAM

標識)とPC check probe (VIC標識)を用いたDuplex real-timePCR法において、コントロールプラスミドではFAMとVICの蛍光増幅が確認されたのに対し、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは、FAMの蛍光増幅のみが確認され、両者を明確に判別できた。これらのことから、我々の開発したコントロールプラスミドを陽性コントロールとして利用したDuplex real-timePCR法によって、検査と同時にコンタミネーションの有無を確認できると考えられた。

そこで、中国四国地方の地方衛生研究所8機関を対象としたDuplex real-timePCR法の模擬訓練を実施したところ、装置3種、試薬3種、またその組み合わせは4パターンであったが、いずれも*R. japonica* 遺伝子が検出可能であり、その定量値もおおむね良好な結果が得られた。また、全ての機関で陽性コントロールプラスミドの検体へのコンタミネーションの有無が確認できており、本法の有用性が確認された。今後、本法の導入を促進し、全国的な検査体制の強化に努めたい。

### 文 献

- 1) Nozomu Hanaoka, Minenosuke Matsutani, Hiroki Kawabata, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Akiko Sakata, Yoshinao Azuma, Motohiko Ogawa, Ai Takano, Haruo Watanabe, Toshio Kishimoto, Mutsunori Shirai, Ichiro Kurane, and Shuji Ando : Diagnostic Assay for *Rickettsia japonica*, Emerging Infect. Dis. , 15, 1994-1997, 2009