

台風 Ketsana による洪水試料からの病原性レプトスピラの検出

東北大学大学院	学生会員	沼澤 聡
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
東北大学大学院	非会員	齊藤麻理子
東北大学大学院	学生会員	山口 諒
東北大学大学院	非会員	押谷 仁
東北大学大学院	フェロー会員	大村達夫

1. はじめに

2009 年の 9 月末にフィリピンのマニラ首都圏を襲った台風 Ketsana (フィリピン名 Ondoy) は過去 40 年間で最も深刻な洪水を引き起こし、多くの人々が長期間にわたり冠水した環境での生活を余儀なくされた。この事態に際して、環境水や土壌を介して伝播する細菌性人獣共通感染症であるレプトスピラ症が流行し大きな被害をもたらした。2009 年 10 月 1 日から 11 月 19 日までに、マニラ首都圏でレプトスピラ症と診断された人数が 1,090 名、レプトスピラ症で死亡した人数が 178 名と報告された¹⁾。感染症の予防・抑制には、流行状況の正確な把握が不可欠である。現在、医療機関において感染者数の報告が行われているが、感染症の予防・抑制などの観点から迅速かつ正確に流行状況を把握するには、環境試料から病原微生物を検出することが有効であると考えられる。

以上の背景より、本研究ではレプトスピラを対象とした既存の TaqMan PCR 法による検出系の比較を行い、加えて既存のプライマー・プローブを評価し、より最適なプライマーを作成した。さらにこのプライマーを用いて環境水中の病原性レプトスピラの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った。

2. 実験方法

2.1 水試料の採取

2009 年の 10、11、12 月の計 3 回にわたり、フィリピンのマニラ首都圏の洪水域 12 地点、及び河川 6 地点において水試料(各 40ml)を採取した。試料は採取後-20℃で保存した。洪水域は時間の経過とともに減少したため、各回を合計して洪水試料 28 試料と河川水試料 11 試料となった(図 1)。

2.2 濃縮

濃縮手法は Ganoza ら²⁾に従った。水試料を室温で 3,000×g、30 分間遠心分離して得たペレットに滅菌超



図1 マニラ首都圏拡大図と試料採取地点

純水を少量加えて、これを濃縮溶液とした。

2.3 遺伝子抽出、逆転写反応

濃縮溶液から QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)、RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) を用いて、それぞれ DNA、RNA を抽出した。抽出した RNA から iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。

2.4 TaqMan PCR 法による遺伝子検出系の比較

TaqMan PCR 法を用いた検出系には、①病原性レプトスピラの 16S rRNA 遺伝子を対象とした系³⁾、②病原性レプトスピラのみが持つ表面タンパク質 LipL32 の遺伝子を対象とした系⁴⁾を用いてレプトスピラ遺伝子の検出を行った。また、検出系①と同じプライマーおよびプローブを用い、RT-PCR 法による 16S rRNA の検出(③)を試みた。結果を比較し、これら 3 種の検出系の検出感度を評価した。

2.6 遺伝子解析に最適なプライマーセットの決定

GenBank からレプトスピラの 16S rRNA 遺伝子配列

Key words: レプトスピラ、台風 Ketsana、レプトスピラ症、TaqMan PCR 法、16S rRNA

連絡先: 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06、TEL: 022-795-7483、E-mail: numazawa@water.civil.tohoku.ac.jp

(計 338 配列) を取得し、既存のプライマーセット³⁾⁵⁾の配列とどの程度一致するかを調べた。また、より多くの病原性レプトスピラを特異的に検出できるプライマーを設計した。

2.7 検出された病原性レプトスピラの遺伝子系統解析

2.6 で設計したプライマーを用いて、16S rRNA 濃度が高い 10 試料に対して RT-PCR を行い、クローニングシーケンシング法により塩基配列を決定した。得た塩基配列から遺伝子系統樹を作成し、どの種のレプトスピラであるか判定した。

3. 結果と考察

3.1 TaqMan PCR 法の検出系の比較

TaqMan PCR 法によるレプトスピラ検出の結果、DNA を検出対象とした検出系①②からは蛍光が検出されなかった一方、16S rRNA を検出対象とした検出系③では 39 試料中 36 試料が陽性となった。したがって検出系③は既存の検出系 (①②) と比較して非常に高感度で病原性レプトスピラを検出できる事が明らかとなった。これは、①②で対象とした遺伝子 (DNA) は 1 つの細胞に最大数個しかないのに対し、検出系③の対象である 16S rRNA は 1 つの細胞の中にリボソームの個数分だけ多数存在しているためと考えられる。このことから、環境水中に存在する病原性レプトスピラを、DNA を対象とした検出系を用いて検出することは困難であり、16S rRNA を対象とした検出系が有効であることがわかった。

3.2 最適なプライマーセットの決定

既存のプライマーセットでは、今回取得した病原性レプトスピラ遺伝子配列の 63~86% としか一致しないことがわかった。そこで本研究で新たにプライマーを設計し、病原性レプトスピラの遺伝子配列の 98% と一致し、非病原性レプトスピラと全く一致しない検出系 (フォワード: GTGTYCGGCCACAATGGA、リバー: CGTTACTGAGGGTTAAAACCC) を作成した。

3.3 検出された病原性レプトスピラの遺伝子解析

35 試料の塩基配列を得ることでき、遺伝子系統樹を作成した (図 2)。病原性の種である *Leptospira wolffii* (19 クローン)、*L. licerasiae* (2 クローン)、*L. kmetyi* (2 クローン) に近縁な配列が検出され、台風 Ketsana による洪水域の環境水中に病原性のレプトスピラ種が存在していたことが示された。一方で、プライマー配列を持たない非病原種のレプトスピラ、および *L. spp.* に属さない配列が得られた。この理由は環境水中での濃度が極め高く、クローニングによって除外すること

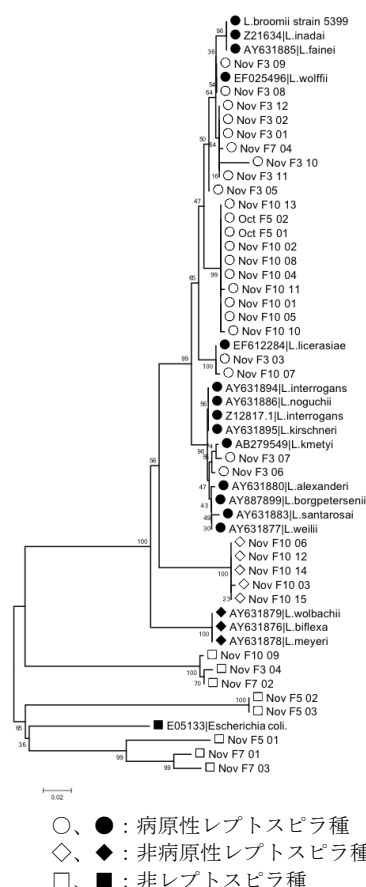


図 2 検出された 16S rRNA 遺伝子配列 (○、◇、□) と GenBank 上の配列 (●、◆、■) から作成した遺伝子系統樹 Nov F3 09 は 11 月に F3 で採取した試料から得られた 9 番目のクローンを表す

ができなかったと考えられる。*L. spp.* に属さない配列はデータベース上に近縁種が存在せず、未知の細菌に由来するものと考えられる。また、今回の洪水で発生した患者がどの種に感染していたかはわかっていないが、一般にヒト患者検体から頻繁に検出される *L. interrogans* に近縁な配列は検出されなかった。

謝辞

本研究は、文部科学省感染症研究国際ネットワーク推進プログラム (フィリピン・東北大学拠点、代表責任者: 押谷仁) および東北大学若手研究者萌芽研究育成プログラム (研究代表者: 真砂佳史) による成果である。

参考文献

- 1) National Disaster Coordinating Council Philippines:
http://210.185.184.53/ndccWeb/index.php?option=com_content&task=view&id=175&Itemid=226 (2009).
- 2) Ganoza et al.: *PLoS Med.*, 3, 8, pp. e308-e320 (2006)
- 3) Smythe et al.: *BMC Inf. Dis.*, 2, pp. 13-20 (2002)
- 4) Stoddard et al.: *Diag. Micro. Inf. Dis.*, 64, 3, pp. 247-255 (2009)
- 5) Tansuphasiri et al.: *South. As. Jour. Trop. Med. Pub. Hea.*, 37, 2, pp. 297-308 (2006)