

One Healthアプローチによる 包括的感染症検査法の開発

直 亨 則 [北海道大学 One Health リサーチセンター/特任講師]
松 野 啓 太 [北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所/准教授]
山 岸 潤 也 [北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所/教授]
杉 達 紀 [北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所/助教]
須 藤 倫 子 [株式会社イーベック/事業開発部長]

背景・目的

北海道は豊かな自然と多様な野生動物が生息する地域で、農業や畜産業が盛んだが、ヒト-動物間の接触が多く、感染症発生リスクも高い。人口密度が低く、医療資源が限られ、冬季の輸送障害も問題となる。これらの課題に対処するため、One Healthアプローチに基づく感染症検査法を開発し、新興・再興感染症に対応できる体制を構築する。また、株式会社イーベックと協力し、病原体に対する特異的抗体の作成と治療法開発を進める。

内容・方法

本事業では、適切な核酸抽出方法の確立を目指し、ヒトを含む多様な動物種や様々な検体を使用して検討を行った。固形検体には凍結粉碎装置と自動抽出装置を、液体検体にはビーズ式破碎チューブとボルテックスミキサーを使用し、効率的な核酸抽出を実施した。次に、特異的病原体検出パネルの開発に取り組み、文献検索を基に既存のリアルタイムPCR法を選定。新型コロナウイルス検査で使用した装置と試薬を基準に、同一装置で複数病原体を検出する方法を整備した。さらに、細菌の16s rDNAを用いた網羅的解析法を開発。16s rDNA全長を増幅し、解析を行う。真菌に対しては、宿主の18s rDNAの増幅を抑制するため、ブロッキングプライマーを作成し、哺乳類と鳥類に対応した方法を確立した。最後に、病原体に対する抗体作製について、株式会社イーベックと共同でペプチドマイクロアレイ解析を通じて、網羅的感染症抗体の解析を進めた。

結果・成果

本研究では、動物由来の病原体検出技術の向上を目指し、核酸抽出方法の確立や特異的病原体検出パネルの開発、細菌・真菌の網羅的解析法の構築、さらには病原体に対する抗体作製の体制構築に取り組んだ。まず、適切な核酸抽出方法の確立のため、メタルコーンを用いた凍結粉碎法を導入した。この方法は、従来のビーズ式破碎装置では粉碎が難しかった高度石灰化検体や骨成分を含む検体、また弾性の高い肺や腸管検体をより細かく粉碎することが可能となった。

次に、特異的病原体検出パネルの開発のため、アナプラズマ、クリプトコッカス、トキソプラズマ、リケッチア、ボレリア、ネ

オスポーラ、ツツガムシ、バルトネラなど、複数の病原体を対象としたリアルタイムPCR法を整備した。本研究では、すべての病原体検出法を単一のPCR装置、PCR試薬、同一反応条件で実施可能とし、効率的に複数病原体を同時検出することが可能となった。さらに、病原体の遺伝子配列に基づき人工合成遺伝子を作成し、陽性対照として定量した。陽性対象には病原体には含まれていない人口配列を付加しており、病原体検出の精度を管理し、コンタミネーションによる誤検出のリスクを低減する。また、精度管理のため、ハウスキーピング遺伝子の発現検証を行い、報告の限られているヒト以外の動物種における適切な内部コントロールについて検討した。

細菌の網羅的解析法においては、16s rDNA全長領域の解析を実施した。その高い網羅性から、検体中の細菌だけではなく、検査実施環境中の細菌についても同時に検出している場合があったが、適切な検査対照の設定により、高精度に検体中の細菌を検出可能となった。

最後に、病原体に対する抗体作製体制の構築を進め、ペプチドマイクロアレイ解析を行った。ヒト検体を対象としたペプチドマイクロアレイ解析では、既知の複数の病原体に対して強い抗体反応が見られ、病原体特異的抗体を対象とした網羅的感染症検査の可能性が示された。

今後の展望

本研究により、適切な核酸抽出法を含め、特異的病原体検出パネル、及び細菌・真菌網羅的解析法が開発された。対象病原体数、感度など今後改善の余地のある部分もあるが、適切な対照の設定等により現時点でも精度管理を含め、臨床検査として提供可能な状態となっている。今後は病原体検出法の整備・開発による検査対象病原体、動物種の拡大、検出法の改良による感度向上、より高い精度管理体制の構築を実施する予定である。なお、本事業で開発・整備した検査の一部については北海道大学One healthリサーチセンターの特殊検査として実施可能である。