

## ダニ媒介回帰熱病原体遺伝子検査のための陽性対照合成

### Synthesis of a Positive Control for the *Borrelia miyamotoi* Disease PCR Test

伊東 拓也

Takuya ITO

**Key words :** *Borrelia miyamotoi* disease (ダニ媒介回帰熱) ; positive control synthesis (陽性対照合成) ; polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

現在当所にてライム病検査と同時・並行して行っているダニ媒介性新興回帰熱検査は、各々の病原体 *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) 及び *B. miyamotoi* (Bm) に対する血液中の特異抗体の検出を主法とし、血液・皮膚片・咬着マダニからの *Borrelia* 属菌遺伝子の検出を病態及び検体の状態に応じて追加している。この遺伝子検査には Hamerら<sup>1)</sup> に準じた PCR 法 (所内名称: Bm-IGS) を採用しており、血液以外の検体には、Ybanezら<sup>2)</sup> による *B. burgdorferi* を標的とした PCR 法も併用している (北海道立衛生研究所感染症検査 SOP No. M-1-2)。Bm-IGS PCR に用いる陽性対照 (PC) には、国立感染症研究所細菌第 1 部より分与いただいた Bm myk3 株より抽出・精製した DNA 溶液を用いている。しかしながら、この PC による試料 DNA への汚染 (いわゆるコンタミネーション) 等に起因する偽陽性が生じた場合、真の陽性との識別ができず誤判定となる可能性がある。対策として、Bm を含む *Borrelia* 属菌とは異なる塩基配列の Bm-IGS PCR のための PC (合成 PC) を PCR 法によって合成し、PC として最適な希釈倍率を決定した。

### 方 法

合成 PC は以下の条件を満たすこととした。

1. Bm myk3 株のゲノムは GenBank<sup>®</sup> に登録されており (Accession No.: AP024392)、Bm-IGS PCR プライマーセット<sup>3)</sup> によるアンプリコンの塩基数は 1st PCR が 588 bp、2nd PCR が 547 bp となる。従って、合成 PC によるアンプリコンは、電気泳動にてこれらと識別できる塩基数であること。
2. 検体が陽性となった場合、確認のためのダイレクトシーケンスで *Borrelia* 属菌とは異なる塩基配列が得られること。

以上 2 点から、当所で昆虫類の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析に用いているプライマーの配列<sup>4)</sup> を用いて合成

PC 作成用プライマー Bm.IGS.PC.F 及び Bm.IGS.PC.R を設計した (Fig. 1)。合成 PC 作成の鋳型には、キンパツヒメクロバエの一種 *Pollenia pediculata* から抽出した DNA を用いた。PCR は、反応液 50  $\mu$ L 当たり 2 倍濃縮 TaKaRa Ex Premier<sup>™</sup> DNA Polymerase Dye plus (タカラバイオ社) 25  $\mu$ L、Bm.IGS.PC.F と Bm.IGS.PC.R プライマー (各 10  $\mu$ M) をそれぞれ 1.25  $\mu$ L、dH<sub>2</sub>O 21.5  $\mu$ L、DNA 鋳型 1  $\mu$ L とした。反応は GeneExplorer GE-96G サーマルサイクラー (Bioer Technology 社) を用いて、前熱変性 94 $^{\circ}$ C 60 秒、熱変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 63 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長 68 $^{\circ}$ C 60 秒とし、熱変性から伸長までの反復を 30 回行った。PCR 後は電気泳動により増幅を確認し、アンプリコンを InnuPREP PCRpure Lite Kit (IST Innuscreen 社) で精製した。精製後のアンプリコンを 10mM Tris-HCl、0.5mM EDTA (pH9.0) で 500、1,000、5,000、10,000、50,000 及び 100,000 倍に希釈した各溶液を鋳型に Bm-IGS PCR を行い、PC として最適な希釈倍率を決定した。

### 結 果

今回作成した合成 PC を用いた Bm-IGS PCR では、1st PCR で 674 bp、2nd PCR で 636 bp のアンプリコンが得ら

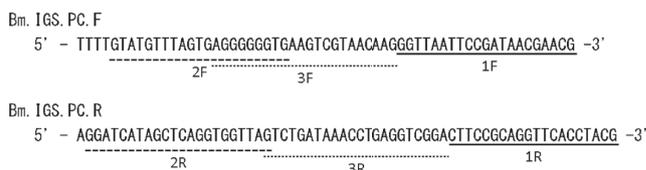


Fig. 1 Primer Pair and Sequences for the Positive Control Synthesis of Bm-IGS PCR.

Range 1F, 18S-Ins.3F<sup>4)</sup> for PCR of a part of 18S rRNA gene of *Pollenia pediculata*; Range 1R, 18S-End R<sup>4)</sup>, the reverse primer of 1F; Range 2F, rrs-rrlA IGS F<sup>3)</sup> for the first PCR of Bm-IGS PCR; Range 2R, rrs-rrlA IGS R<sup>3)</sup>, the reverse primer of 2F; Range 3F, rrls-rrlA IGS F<sup>3)</sup>, the second PCR of Bm-IGS PCR; Range 3R, rrls-rrlA IGS R<sup>3)</sup>, the reverse primer of 3F.

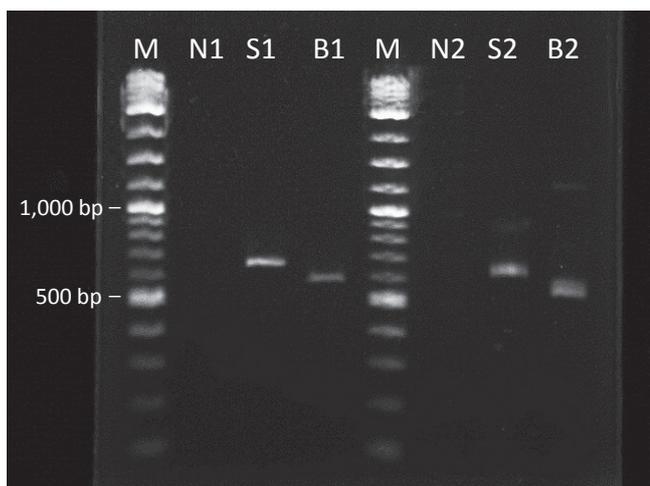


Fig. 2 Bm-IGS PCR Results of Positive Controls.

An agarose gel electrophoretogram, with ethidium bromide staining, is shown. Lane M, molecular size markers; Lane Nx, *Pollenia pediculata* DNA as negative control; Sx, synthesized positive control in this study; Bx, *Borrelia miyamotoi* strain myk3 DNA as previous positive control. x=1, the first PCR; x=2, the second PCR.

れた。さらに、50,000倍希釈液がPCとして良好、すなわ

ちBm myk3株PCと同等のバンドの電気泳動像を示した (Fig. 2) ことから、50,000倍希釈液を合成PCとして分注、保存した。今後、試験的な運用と評価を経てSOPを改変し、現在のBm myk3株PCと置き換える予定である。

## 文 献

- 1) Hamer SA, Hickling GJ, Keith R, Sidge JL, Walker ED, Tsao JI: Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. *Parasites Vectors.*, **5**:231 (2012)
- 2) Ybanez AP, Sato F, Nambo Y, Fukui T, Masuzawa T, Ohashi N, Matsumoto K, Kishimoto T, Inokuma H: Survey on tick-borne pathogens in Thoroughbred horses in the Hidaka district, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **75**(1), 11-15 (2013)
- 3) Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG: Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology*, **150**, 1741-1755 (2004)
- 4) Noguchi S, Ochiai T: The first record of *Cucullia umbratica* (Lepidoptera: Noctuidae) from Japan. *Biodivers. Data J.*, **7**, e34197 (2019)