

参考資料：顕微鏡による芽胞の簡便な確認方法

水道水等に故意に炭疽菌芽胞などの病原微生物が投入された場合には、濃縮試料中には相当量の芽胞等が補足されているものと考えられる。従って、濃縮試料から多量の芽胞を顕微鏡観察により確認することが可能と考えられる。そこで、濃縮試料につき以下の方法で観察を行ない、異常事態の発見に努める。なお、上水に含まれる芽胞は0.5/100mL個程度であるとの報告がある。従って、凝集沈殿ろ過の浄水処理工程を経た上水に多量の芽胞が含まれることは基本的にありえず、濃縮試料中に多量の芽胞が検出される状況は何らかの事故あるいは人為的な汚染を想定すべきである。

なお、濃縮試料から病原微生物を検出するには培養、特異遺伝子検出(PCR)、等を用いた科学的な検証が必要である。これらの専門的検査法をただちに浄水施設に導入することは容易ではない。現在、各自治体において緊急時対応の検査体制が確立されつつあり、これらの検査体制との緊密な連携が重要である。

材料

墨汁

生物顕微鏡(微分干渉顕微鏡装置付き)

方法

Bacillus 属菌類芽胞の顕微鏡観察方法として、墨汁染色方法を紹介する。中空糸膜や遠心沈殿法により得られた濃縮試料に対し1~2/100程度の墨汁を添加し、400倍で観察する。芽胞は微細なコロイド粒子の中

に光を強く屈折する単桿状の1 μ m程度の粒子として認識できる(図7)。コンデンサー絞りを調整することで観察しやすい象を得ることができる。一般の明視野観察では焦点の位置を調整することで、芽胞を確認することができる。(図8)。芽胞の形状は極めて均質である。

結果および考察

B. subtilis の芽胞を墨汁染色した結果を図1に示す。高濃度の汚染があった場合には芽胞の確認は可能である。顕微鏡観察は緊急を要するような高濃度汚染を迅速に検知することを目的としており、低濃度の汚染の検出を想定していない。

仮に汚染された水道水中の芽胞数を 10^3 /100mLと想定すると、20Lの水道水の濃縮試料中には 2×10^5 の芽胞が回収される。これを0.2mLにまで濃縮して、そのうちの10 μ Lをスライドグラスに載せ、400倍で顕微鏡観察を行うと、1視野あたりの芽胞数は8.6と算出される。

1見して芽胞の存在が認識できる数を1視野あたり50以上とした場合、120Lからの濃縮物を200 μ Lに懸濁して10 μ Lを観察に供すれば1視野に含まれる芽胞数は52となり、目視による検出が可能になると考えられる。観察者の訓練次第で感度の向上が期待される。

一定濃度での汚染が長時間続くことは実際的ではなく、一時的な高濃度汚染の後は徐々に濃度が減少すると想定される。配水池等各種設備の容量や滞留時間を考慮し、試験すべき水量と間隔を適切に設定することが重要である。

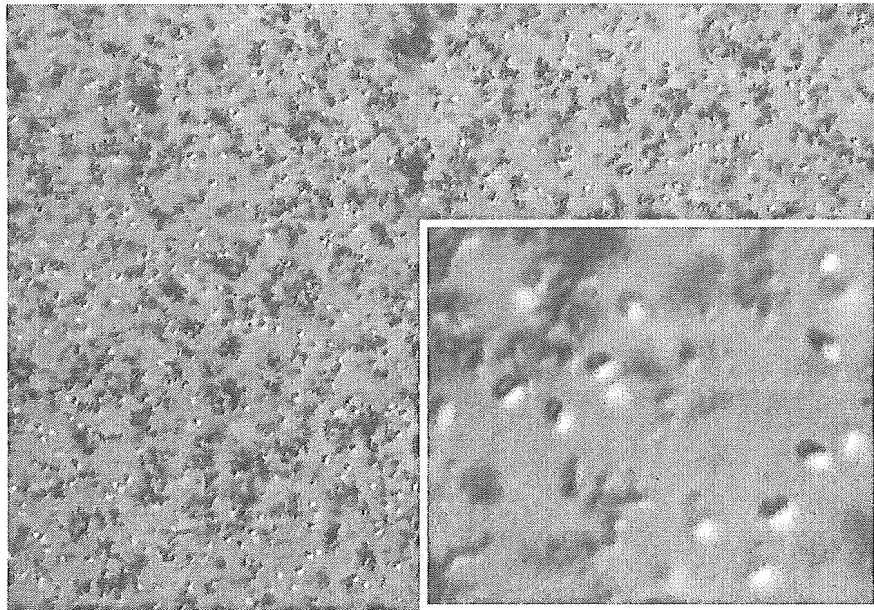


図7 芽胞の墨汁染色

墨汁は炭素粒子のコロイドにあり、無色透明の溶液に多数の黒い色素が浮いている。芽胞は色素の隙間に見られる。芽胞は無色を保つが、その他の粒子は黒く観察される。芽胞中の左上に影があり、右下は光をよく反射している。写真右下は一部拡大図を示した。

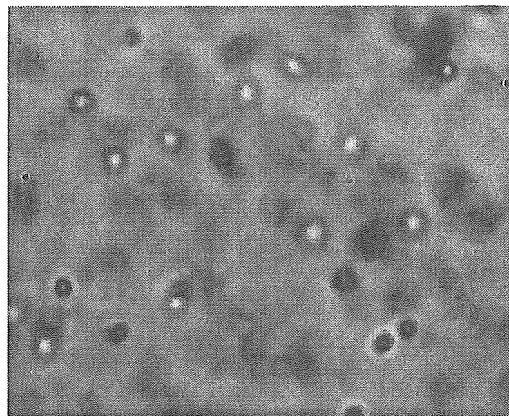


図8 明視野顕微鏡による芽胞の観察

焦点を若干ずらすと、芽胞が1周り大きな単桿状に見える。開口絞りを調整する（絞る）と観察が容易となる。

水道におけるバイオテロ対策としての迅速高感度な細菌検出方法の開発

分担研究者 伊藤健一郎 国立公衆衛生院衛生微生物学部（現国立感染症研究所）
協力研究者 松崎 充宏（社）日本海事検定協会理化学分析センター食品衛生チーム
泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部
高木 弘隆 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

概要

バイオテロリズムにより水道水に混入されることが予想される病原微生物を常時監視し、迅速かつ高感度に検出する試験方法を開発することを目的とした。

本研究では、迅速性を最重点に置くため、培養試験を行わず、高感度の遺伝子検出法を検討した。現時点で普及していて速やかに態勢が整えられると思われる通常のPCR法では、なるべく多くの病原菌を対象にスクリーニングして、確定試験で同定できるようにした。一方、導入が進みつつあるリアルタイムPCR法では、菌種を絞り1回の試験で同定できるようにした。

菌種特異的なPCRでは、炭疽菌・ペスト菌・コレラ菌・チフス・パラチフス菌・赤痢菌出血性大腸菌の各菌種に特異的な染色体上の遺伝子を標的としたスクリーニング法と確認用のPCRにより、診断が可能である。現時点ではこの方法が最も実用に適していると思われる。他の菌との鑑別が必要な菌種もあるので、菌培養を合わせて行うのがベストと考えられる。

広範囲の菌を対象とするPCRではリボゾームを標的とし、バチルス属など一部の菌は検出されにくかったが、広範囲の細菌を検出できた。しかし、増幅産物のサイズはほとんど同じで、増幅産物の変異を調べるヘテロ2本鎖移動度解析(HMA)法を用いても種の推定には不十分であった。試料中の物質によるPCRの効率チェックには利用可能と考えられた。一方、16S・23Sのスペーサー領域を標的としたPCRでは種によりパターンとその多様性に差があり、菌種の推定を行える可能性はみられた。しかし、現時点での導入は実用的ではないと思われた。

リアルタイムPCRでは、TaqMan probe ケミストリを採用して、特異性が高く、迅速な炭疽菌のスクリーニング及び確認用のリアルタイムPCRを開発した。リアルタイムPCRはおよそ30分で結果が得られ、チューブあたり1個の菌を検出できた。炭疽菌の芽胞は塩素に耐性を持ち、水道水に対するテロで最も警戒が必要とされるため、スクリーニングだけでなく確認試験法も開発した。ペスト菌・赤痢菌・チフス菌・パラチフス菌のスクリーニング法も開発した。本法は、診断に大いに役に立つと予想されるので、保健医療科学院の平成14年度の新興再興感染症研修においてリアルタイムPCRを導入し、普及を図った。

A. 研究目的

バイオテロリズムにより水道水に混入されることが予想される病原微生物を常時監視し、迅速かつ高感度に検出する試験方法を開発することを目的とする。

いわゆる生物兵器として利用することが予想される病原性細菌（炭疽菌・ペスト菌・赤痢菌・チフス菌・パラチフス菌・コレラ菌・出血性大腸菌）がテロ行為により水道水に混入されることを想定した場合、常に監視し、迅速にこれを検知する事は被害を最小限に抑えるため極めて重要である。現在一般的に行われている病原細菌の試験方法では、試料採取から検出・確定までに数日間を要する。こうした方法では、病原細菌の確定時点では、被害は拡大し、手遅れになることが予想される。

本研究では、迅速性を最重点に置くため、通常使われている培養試験を行わない。また、テロリズム行為に使用される病原細菌は菌量が少なくとも感染が成立するため、検出感度を可能な限り高くすることを目的とした。この条件を満たす試験法として遺伝子直接検出法を用いた。現時点で普及し

ていて速やかに態勢が整えられる通常のPCR法を用いた方法に加えて、導入がされつつあるリアルタイムPCR法も対象とした。PCRは、実際の検査を担うと思われる地方衛生研究所では日常の検査に組み入れられている。検査技術も高く、結果を見て次の対応への判断もできると思われるため、なるべく多くの病原菌をスクリーニングし、その後確認用のPCRで同定する試験方針をとった。一方、リアルタイムPCRの装置には検出装置が内蔵され電気泳動を行うことなくリアルタイムに結果が見られるので、コンタミネーションの危険性が低く、結果が得られるまで時間も短い。習熟度にこだわらずに活用でき、より現場に近い検査員が使用するのに適している。そこで、速やかに対応できるように、追加の試験をすることなく種の推定ができるようにした。

本研究は、上水道の試験にはリアルタイムPCRで監視し、異常を速やかに感知し、当該水道試料を地方衛生研究所で遺伝子の追加試験及び分離培養で同定確認する、水道危機管理体制を構築するのを目的とする。

表1 本研究の対象菌とスクリーニング及び鑑別用の遺伝子

菌種	スクリーニング (染色体)	産物サイズ	類似菌	鑑別	
				(病原性関連)	(その他)
炭疽菌	S-Layer	639bp	バチルス属	莢膜・毒素	—
ペスト菌	Invasin	195bp	エルシニア属	莢膜・侵入性	外膜タンパク
コレラ菌	コレラ毒素	380bp	ビブリオ属	制御因子	O抗原
チフス菌	Paratose	235bp	サルモネラ属	Vi抗原	O抗原・H抗原
パラチフス菌				—	
赤痢菌	ipaH	140bp	大腸菌	侵入性	—
出血性大腸菌	ベロ毒素	228bp	大腸菌	毒素・付着性	O抗原・H抗原

B. 研究方法

1) 通常の PCR の標的遺伝子

1組の primer を用いて広範囲の菌種を検出する方法とそれぞれの病原菌の数だけ特異的な primer を使用する方法を検討した。

広範囲の PCR には、リボゾームや生存に必須 (ハウスキーピング) の遺伝子群がよく用いられるが、今回はグラム陽性菌から陰性菌まで含まれるため、16S または 23S のリボゾームをコードしている DNA を標的に選択した。また、16S と 23S の間のスペーサー領域は意味のある配列を含んでいないためリボゾーム内の配列より変化したものも保持されていることが多く、菌種または株間の鑑別に利用されているので、これも検討した。

菌種特異的な PCR には多くの遺伝子が対象とされている。スクリーニングに用いるために、しばしば脱落するプラスミド上にコードされる遺伝子ではなく、染色体上にあり可能なら病原性に関連するものを選択した。対象とした遺伝子を表 1 に上げる。スクリーニング試験で検出されうる類似菌と鑑別するために、複数の遺伝子を使用するがこの目的では染色体にはこだわらなかった。

2) リアルタイム PCR の標的遺伝子

リアルタイム PCR では、できるだけ1回の試験で対象とした菌を同定できるように、さらに特異的な遺伝子を対象とした。炭疽菌では現時点で報告されている炭疽菌特異的な遺伝子または配列を検討した。通常の PCR で標的としている表面構造物質 (S-layer) に加え、RNA 合成酵素の他のバチルス属と配列が異なっている箇所を primer とした。ペスト菌では仮性結核菌にも存在する *invasin* に加えペスト菌特異的配列も検討した。チフス菌では、本菌の他にいくつかの血清型で報告されているが、分離頻度は極めて低く、通常は遭遇しない Vi 抗原を標的とした。パラチフス菌では Tyvelose 合成酵素遺伝子を標的とし、O2 血清型で変異している箇所をプライマーとした。

3) primer の設計

今回、標的とした遺伝子の中には DNA 多型や変異しているものがある。データベースからこれらの遺伝子の配列を選び出し、CLUSTALW

(<http://clustalw.genome.ad.jp/>) で多重アラインメントを行い、目的の遺伝子だけを検出するようにプライマーを設計した。

表 2 リアルタイム PCR の対象遺伝子

菌種	スクリーニング (染色体)	類似菌	鑑別
炭ソ菌	S-Layer・ <i>rpoB</i>	バチルス属	きょう膜・毒素
ペスト菌	ペスト菌特異的配列	無し	—
チフス菌	Vi 抗原	一部のサルモネラ	O 抗原・H 抗原
パラチフス菌	Tyvelose (O2 血清型特異的)	O2 血清型サルモネラ	H 抗原
赤痢菌	<i>ipaH</i>	侵入性大腸菌	侵入性

マルチプレックス PCR で行うためには、プライマーの融解温度 (T_m) を同じ程度にし、電気泳動で分離できるように産物の長さを考慮しながら設計した。リアルタイム PCR では産物の長さが短いほうが効率がよいことから 200bp 以下とし、プライマーの T_m は 55°C を最適として範囲を 50°C~60°C に、プローブの T_m は 65°C を最適として範囲を 60°C~70°C に設定し、両者の T_m の差が 10°C 程度異なるようにした。設計支援プログラムは P primer3

(http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) を使用した。

プライマーの合成はグライナー・ジャパンに依頼した。5' 末端と 3' 末端に、蛍光物質とその蛍光波長を吸収するクエンチャーを結合した TaqMan probe の合成は Advanced Biosystems に依頼した。蛍光物質として一般的に FAM を、一部のプローブには同時検出用に VIC を使用し、クエンチャーとしては TAMRA を用いた。

プライマーとプローブの一覧は本報告の最後に掲載した。

4) テンプレート DNA の調製

テンプレート DNA の調製は SepaGene(三光純薬)または FastPrep DNA (Bio101) キットを用いて行った。すなわち、寒天平板上に一夜培養した菌体または濃縮水道水の遠心沈殿物を、蒸留水または菌液調製用の試薬に懸濁し、後は使用説明書に従った。FastPrep DNA キットはスピнкаラム法を用いた。一部の通常 PCR

用テンプレートは、寒天平板上に一夜培養した菌体を 100 μ l の蒸留水に懸濁し、100°C で 10 分加熱して調製した。

5) 通常 PCR

反応液は最終 25 μ l で、0.1~0.2 μ M プライマー溶液、0.1mM dNTP 混液、 \times 1 PCR 緩衝液、1.5mM $MgCl_2$ 溶液、0.5U Taq DNA ポリメラーゼ(プロメガ)、テンプレート 2.4 μ l である。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 システム(パーキンエルマー)を使用し、5 分間の熱変性を行い、熱変性 94°C、30 秒、アニーリング 50~55°C、1 分、伸長反応 72°C、1 分 30 秒のサイクルを 25 回繰り返し、最後に 72°C、10 分間の最終伸長反応を行った。それぞれのプライマーを使用したときのアニーリング温度は、「プライマーとプローブ一覧」に記載した。マルチプレックス PCR では、産物の量が同じになるようにプライマー濃度を調整した。

産物は 13%ポリアクリルアミドゲル、不連続緩衝液系の電気泳動で分離し、エチジウムブロミド染色後、トランスイルミネータのもとで写真を撮った。

6). リアルタイム PCR

反応液は最終 25 μ l で、0.3 μ M プライマー溶液、0.2 μ M プローブ溶液、0.3mM dNTP 混液、 \times 1 PCR 緩衝液、3.5mM $MgCl_2$ 溶液、1.25U Takara ExTaq DNA ポリメラーゼ(宝酒造、R-PCR バージョン)、である。テンプレート量は 1~10 μ l の範囲で変え、蒸留水で量を調整した。サーマル

サイクラーは Smart Cycler(Cepheid)を使用した。最初に 95°C、30 秒間の熱変性を行い、続いて、熱変性 95°C、5 秒、アニーリング・伸長反応 60°C(一部は 55°C)、30 秒の 2 ステップサイクルを 40 回繰り返した。アニーリング・伸長反応ステップで蛍光強度を測り、産物の生成量を測定した。それぞれのプライマーを使用したときのアニーリング温度は、「プライマーとプローブ一覧」に記載した。

コピー数の推定には Ct (Cycle threshold、サイクル閾値) を 30 蛍光単位に設定して行った。

7) ヘテロ 2 本鎖移動度解析 (HMA)

Ganguly らの方法¹⁾ を改変して行った。

原理を図 2 A に示した。PCR 産物を適量とり、最終濃度 10mM EDTA 溶液、10 μl になるように混ぜ、サーマルサイクラーで 94°C、5 分熱変成させた後、72°C 3 分、50°C 一時間加熱してヘテロ 2 本鎖を形成させた。7.5%のポリアクリルアミド電気泳動、不連続緩衝液系で泳動して分離した。HMA 型を調べる際には被検査 PCR 産物を腸炎ビブリオ由来の増幅産物と混ぜた。

8) 菌株および DNA テンプレート

使用した菌株は国内分離株を使用した。炭疽菌・チフス菌・パラチフス菌・ペスト菌は感染症研究所から DNA 溶液を分与していただいた。

C. 結果

1) 広範囲の菌を対象とする PCR

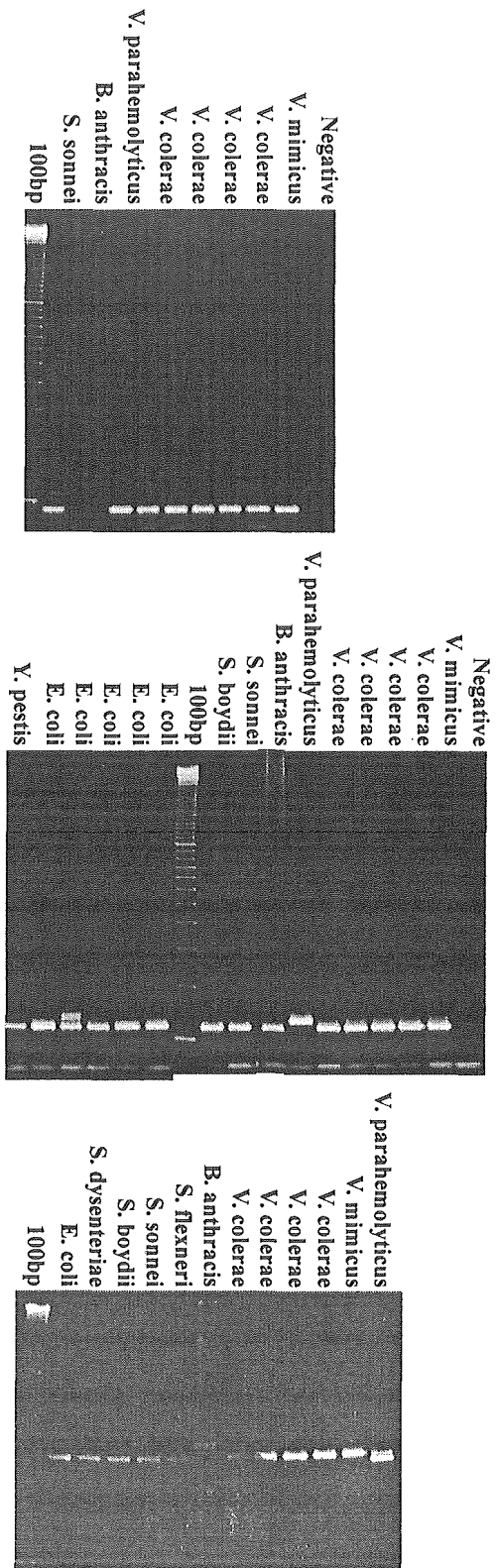
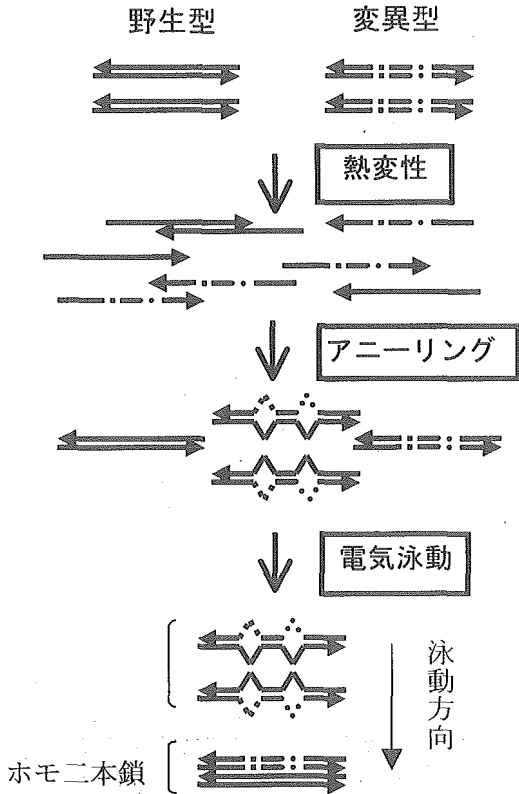


図 1 リボゾーム DNA を標的とした PCR
16S リボゾームの可変領域をはさんだ保存

A) HMA の原理



B) 16S rDNA U-primer 産物の HMA

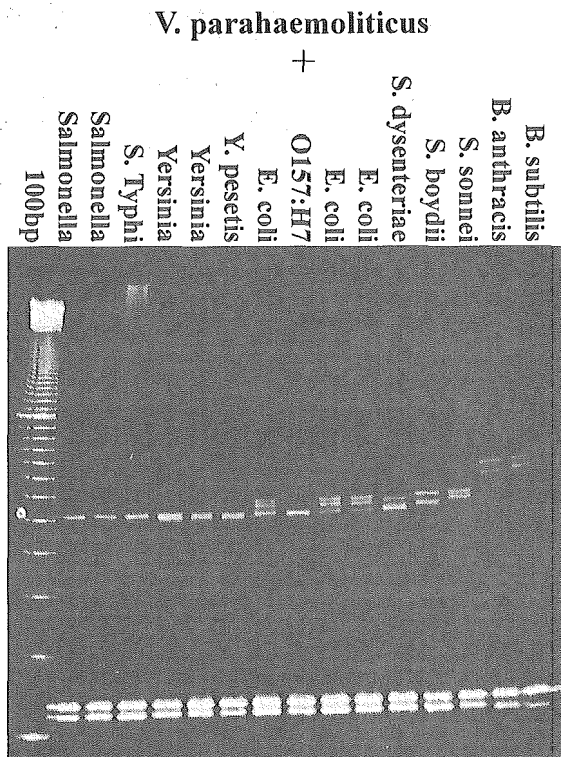
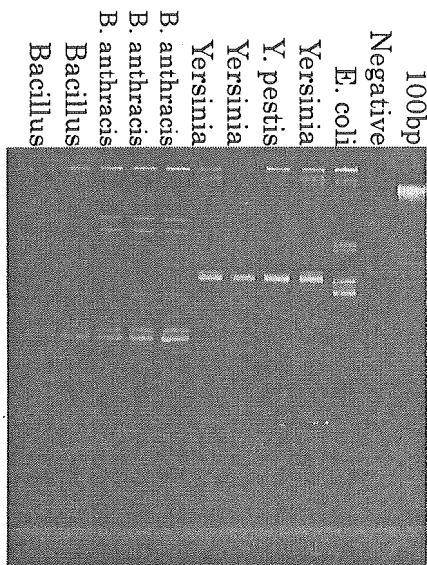


図 2 rDNA の HMA

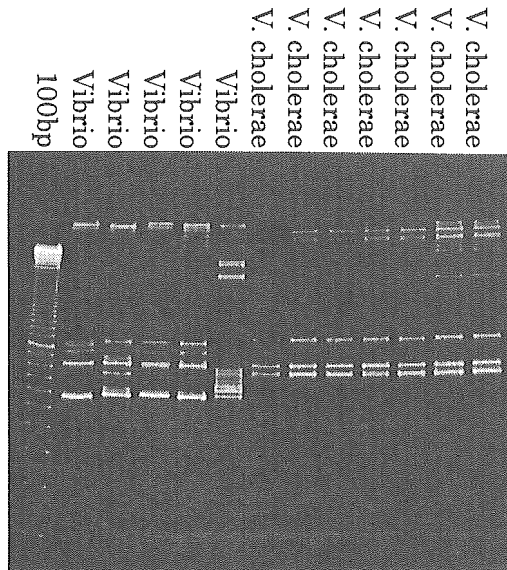
領域を使用した PCR は、U-primer と R-primer を使用した。23S リボゾームの可変領域をはさんだ保存領域を使用した PCR は、FR-primer を使用した。どちらも、広範囲の細菌を検出できたが、バチルス属など一部の菌はバンドが弱かった(図 1)。また、増幅産物のサイズは、同じかわずかに異なるだけでこのままではどの種類の菌かは推定できない。増幅産物の配列の多様性を簡便に調べる方法として、HMA 法を用いて解析した。この方法は、由来の異なる 2 種類の増幅産物を混合し、熱変性して一本鎖とした後、ゆっくり冷却して異種の 2 本鎖を形成させ、そのアクリルアミド電気泳動における移動度により両鎖間の変異の大きさを調べることができる (図 2A)。最も効率のよかった 16S の U-primer の増幅産物を使用し、電気泳動で移動度が最も異なる腸炎ビブリオ菌由来の産物を標準として使用した。図 2B に結果を示した。バチルス属と腸内細菌科の間には少し差が見られるが、種の推定はこれだけでは不十分であった。

16S-23S のスペーサー領域を増幅させた結果を図 3 に示した。バチルス属はいろいろなパターンが見られるが、炭疽菌はそれらとは異なり、互いに区別がつかない同じパターンを示している (図 3A)。コレラ菌も他のビブリオ属とは異なり、ほぼ同じパターンを示している (図 3B)。チフス菌・パラチフス菌はそれぞれ同じパターンであり、他血清型のサルモネラにも似たような

A) バチルス属とエルシニア属

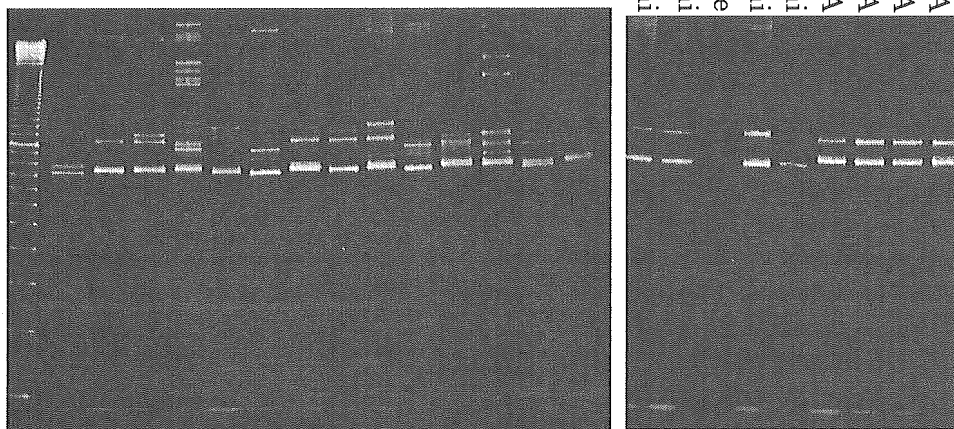


B) ビブリオ属とコレラ菌



C) サルモネラ菌とチフス菌

Salmonella 血清型



D) 大腸菌と赤痢菌

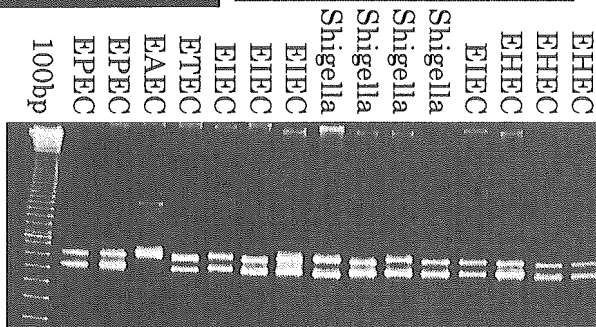


図3 16S-23S スペーサー領域を用いたリボタイピング

表3 リボタイプと16SrDNA 配列との比較

番号	リボタイプ	16SrDNA 配列からの菌種候補
59	1a	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>
74	1a	<i>B. cereus</i>
1	1a	<i>B. cereus/thuringiensis</i>
28	1a	<i>B. cereus/thuringiensis</i>
48	1a	<i>B. thuringiensis/cereus</i>
15	1b	<i>B. mycooides</i>
32	1c	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>
43	1d	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>
70	2a	<i>B. pumilus</i>
6	2a	<i>B. subtilis</i>
52	2a	<i>B. subtilis</i>
34	2a	<i>B. subtilis</i>
21	2a	<i>B. subtilis</i>
80	2a	<i>B. subtilis</i>
3	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
24	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
57	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
62	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
75	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
2	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
14	2a	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
71	2c	Soil bacterium S99D1
35	4a	<i>B. licheniformis/amiliensis</i>
19	4a	<i>B. licheniformis</i>
38	4a	<i>B. licheniformis</i>
29	7a	<i>B. megaterium</i>
33	7b	<i>B. megaterium</i>
17	others	<i>B. fumarioli</i>
50	others	<i>B. megaterium</i>
36	others	<i>B. pseudomegaterium</i>
22	others	<i>B. subtilis/licheniformis</i>
20	others	<i>Bacillus</i> sp. Domas clone A4
66	others	<i>Paenibacillus alvei</i>

河川分離株の16S-23S スペーサー領域のリボタイプと16S rDNA 配列のblastNで検索した菌種の候補と比較した。リボタイプ3, 5, 6, 8-10はOthersとした。

パターンはあるが、推定は可能と思われる(図3C)。大腸菌および赤痢菌も互いに似ていた(図3D)。また、炭疽菌を含むバチルス属は他の腸内細菌やビブリオ属とは明らかに位置が異なっていた。

取水口に近い河川水から、熱に強いバチルス属

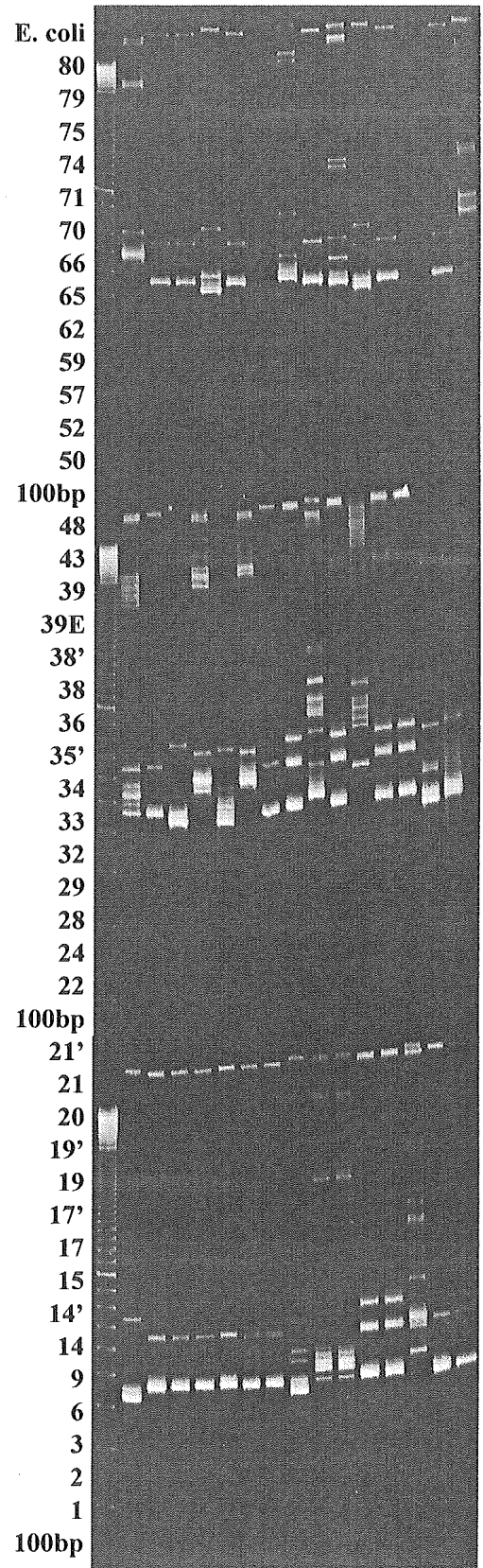
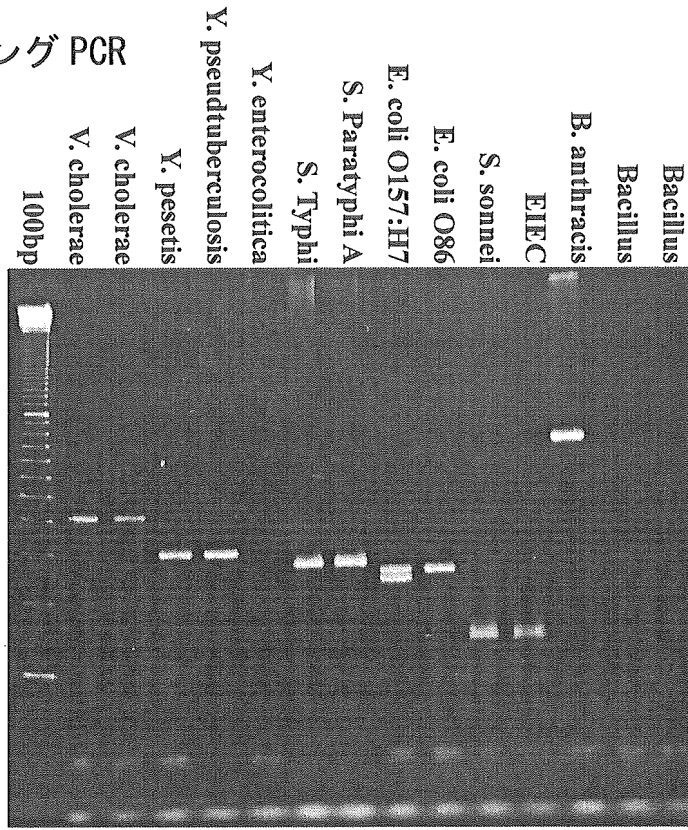
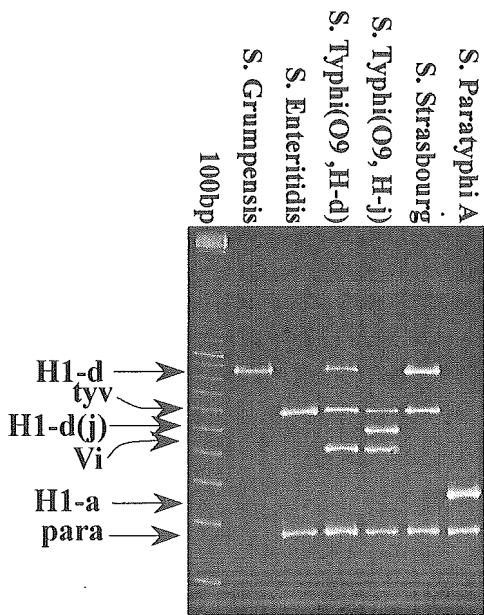


図4 河川分離株の16S-23S スペーサー領域のPCR

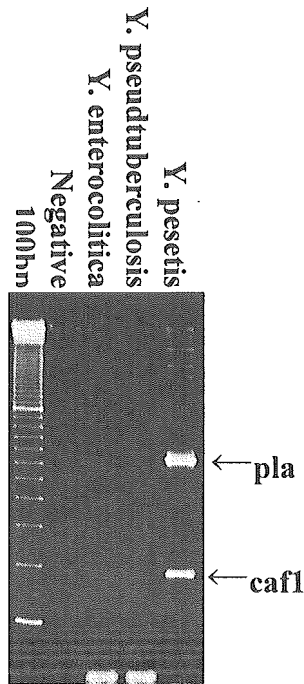
A) スクリーニング PCR



B) チフス菌・パラチフス菌の確認



C) ペスト菌の確認



D) 炭疽菌の確認

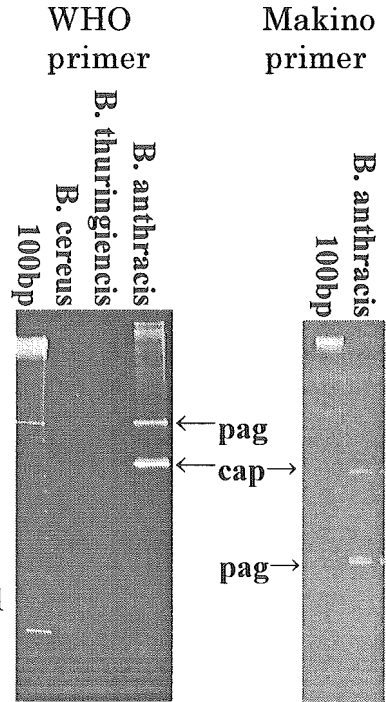


図5 菌種特異的な primer によるスクリーニングと確認 PCR

を選択して分離した菌を調べたところ、図4に示される結果となった。仮にパターンに番号を振り、16S リボゾーム遺伝子の塩基配列から推定される菌種と付き合わせた(表3)。パターン1は炭疽菌を含むセレウス類似菌に分類され、パターン2は枯草菌または *B. lichenformis* に分類されている。パターン4は *B. lichenformis*、パターン7は *B. megaterium* に分類されていた。いくつかの例外があり、また例数も少ないため追加実験が必要であるが、同じパターンを示す菌は同じカテゴリーに相当し、種の推定には使用できる可能性はある。

2) 菌種特異的な PCR

各菌種に特異的な PCR 法として、染色体上の遺伝子を標的としたプライマーによる PCR の結果を図5に示した。ペスト菌、チフス菌・パラチフス菌、腸管出血性大腸菌はゲル上で、移動度の違いによる区別は難しい。また、すべてのプライマーを混合したマルチプレックス PCR では写真に示したようにうまく行くこともあるが、すべての菌が陰性の場合には紛らわしいバンドが見られることもあり、ルーチン化するにはコレラ菌・チフス・パラチフス菌・赤痢菌の組み合わせと炭疽菌・ペスト菌・出血性大

腸菌の組み合わせにすれば判定が簡単であろう。疑われるバンドが得られた場合は、個々のプライマーセットで行うか、追加の確認法を使用する。コレラ菌はコレラ毒素を産生する他のビブリオ属と、ペスト菌は同じ遺伝子を持つ仮性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) と、チフス菌・パラチフス菌は他の O2 及び O9 血清型サルモネラと鑑別する必要がある。炭疽菌は病原性に関するプラスミドが存在するかを試験する。図5のBからDにそれぞれの菌種の鑑別用 PCR を示した。

3) リアルタイム PCR

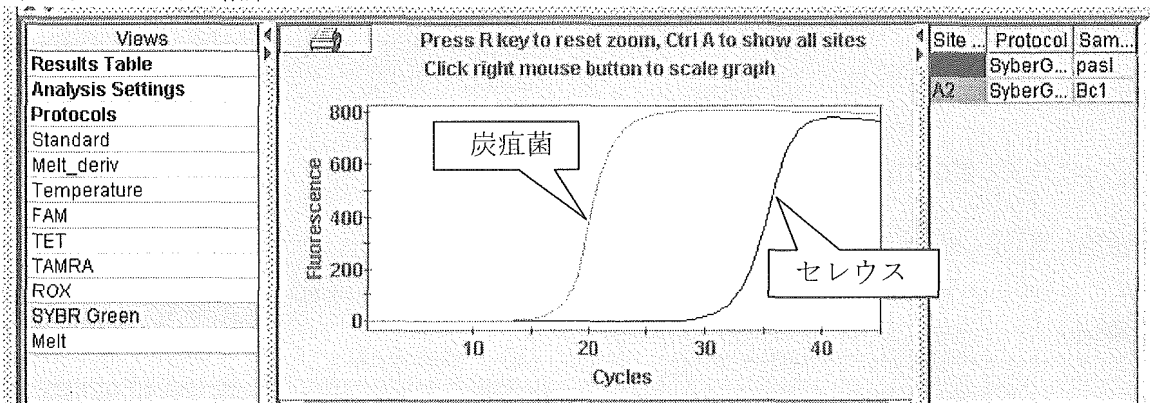
イ) 炭疽菌

炭疽菌では、スクリーニング及び確認用のリアルタイム PCR を検討した。サイバークリーンI等のインタカレータを用いて増幅産物を検出する方法は、TaqMan Probe が不要なので設計が簡単でコストも安い。最初に、S-layer のプライマーとサイバークリーンIを用いて、図6Aのプロトコルに従ってインタカレータケミストリを試した。サイクル数が多くなったときに陰性であるべきのセレウス菌にシグナルが見られた(図6B)。産物の融解曲線から、非特異的な複数の産物にシグナルによることが推定さ

A) SyberGreenI 使用時のプロトコル

Views	Protocol Name		
Results Table	SyberGreen		
Analysis Settings			
Protocols			
Standard	Stage 1		
Melt_deriv	Hold		
Temperature			
FAM	Temp	Secs	Optics
TET	95	120	Off
TAMRA			
ROX			
SYBR Green			
Melt			
	Stage 2		
	Repeat 45 times.		
	3 Temperature Cycles		
	Temp	Secs	Optics
	95	15	Off
	55	30	On
	72	30	Off
	Stage 3		
	Hold		
	Temp	Secs	Optics
	72	120	Off

B) リアルタイム結果



C) 融解曲線微分

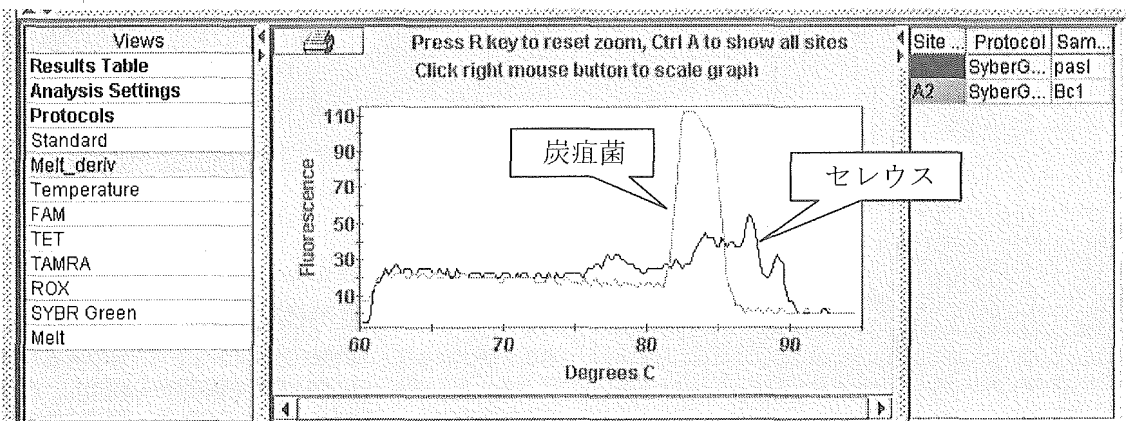


図6 サイバーグリーンI を用いたリアルタイムPCRの結果

れた(図 6C)。従って、本研究ではインタカレータケミストリではなく、より特異性の高い TaqMan probe ケミストリを採用した。

スクリーニング用には、S-layer 遺伝子の *sap* に加え、炭疽菌に特異的な染色体上の遺伝子または配列で PCR 法が報告されている *rpoB* も検討した (図 7)。セレウス菌と枯草菌からはシグナルは得られず、炭疽菌から特異的に検出された。プロトコルは、94°C、15 秒間熱変性、55°C、15 秒間アニーリング、72°C、60 秒間伸長の 3 ステップ法でも検出できたが、95°C、5 秒間の熱変性と 55°C、30 秒間のアニーリング・伸長の

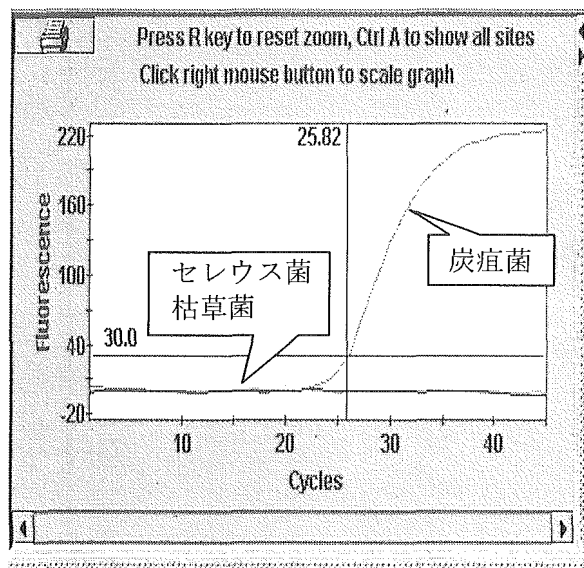
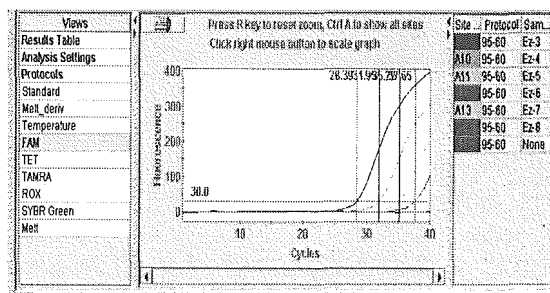


図 7 *sap* を標的としたリアルタイム PCR *sap* を標的として、TaqMan ケミストリでリアルタイム PCR を行った 炭疽菌・枯草菌・セレウス菌のテンプレート をチューブあたり 1 μ l 使用した

2 ステップ法が最も効率がよかった。検出感度を調べた結果を図 8 に示した。10⁷ 個/ml の炭疽菌の芽胞から精製した DNA を 10 倍段階希釈したものを、チューブあたり 10 μ l 使用した。100 万倍希釈まで検出され、検出感度は 10 個/ml で、チューブあたりになると 0.1 個となる。コロニーを数えて原液の個数を推定しているが、

A) FAM 蛍光強度



B) 標準直線

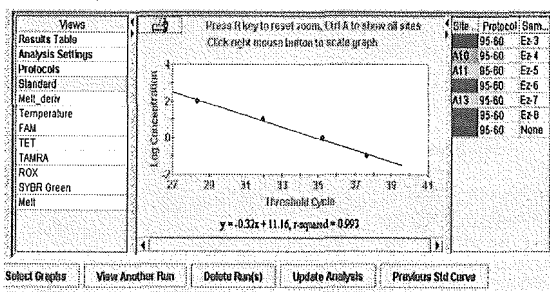


図 8 *sap* を標的としたリアルタイム PCR の炭疽菌芽胞の検出感度

sap を標的として、TaqMan ケミストリでリアルタイム PCR を行った テンプレート DNA は炭疽菌芽胞から精製し、10 倍段階希釈をチューブあたり 10 μ l 使用した 原液の炭疽菌芽胞数は 10⁷ 個/ml.

$$y = -0.32x + 11.16$$

$$r - \text{squared} = 0.993$$

芽胞になる際に死滅した菌があり、DNA は生菌数より多いことを示していると思われる。*rpoB* も炭疽菌に特異的に検出できた。

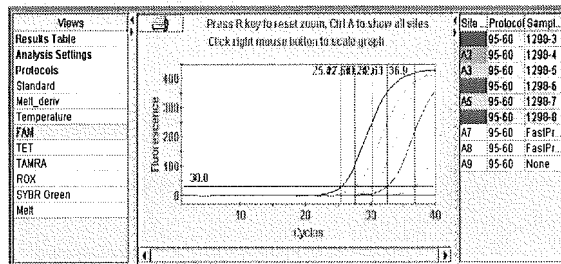
炭疽菌の試験によく使われている2つのプラスミド由来の遺伝子、*cap* と *pag* を確認用試験とした。牧野らが最近報告したプライマーを参考にしたが、*cap* では増幅産物が大きいので、センスプライマーは設計しなおした。炭疽菌に特異的に良好に検出できた。

河川水由来で炭疽菌に類似した菌を、リアルタイムPCRで調べたところ、そのうちのNo.1株は *sap* 及び *rpoB* が検出された。*cap* と *pag* は検出されなかったため、炭疽菌でプラスミドを失った株か、同じかまたはよく似た遺伝子を持つ他の菌であることを示している。今回の調査では全体で100以下の菌株を調べただけだが、そのうちの1株が本遺伝子を保有していた。

ロ) そのほかの菌のリアルタイムPCR

リアルタイムPCRではPCRとは異なる遺伝子または配列を標的としているものがある。方法の標的遺伝子に記述したように、ペスト菌は *invasin* に替え、機能は不明だがペスト菌に特異的と報告されている染色体上の配列 (Ype3a) を標的にした。チフス菌・パラチフス菌に用いた

A) FAM 蛍光強度



B) 標準直線

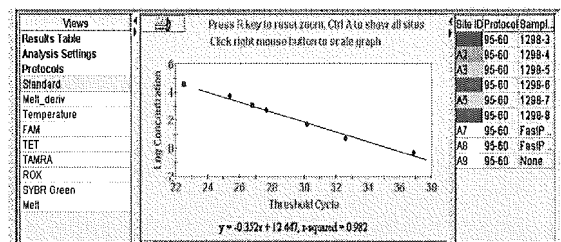


図9 *ipaH*を標的としたリアルタイムPCRの赤痢菌検出度
*ipaH*を標的として、TaqMan ケミストリでリアルタイムPCRを行った。テンプレートDNAは赤痢菌から精製し、10倍段階希釈を1μl使用した。原液の赤痢菌は 5×10^9 個/ml。

$$y = -0.325x + 12.447, \quad r\text{-squared} = 0.982$$

paratose 合成酵素をチフス菌は Vi 抗原に、パラチフス菌は tyvelose 合成酵素に変えた。赤痢菌はそのまま *ipaH* を使用したが、感度が低かったためプライマーを設計しなおした。すべての試験法で良好な結果が得られた。

5×10^9 個/ml の赤痢菌から精製した DNA を10倍段階希釈し、チューブあたり1μl使用して、*ipaH* を標的に検出限界を測定した。1000万倍希釈まで検出された(図9)。従って、検出感

度は 500 個/ml で、チューブあたりになると 0.5 個となる。

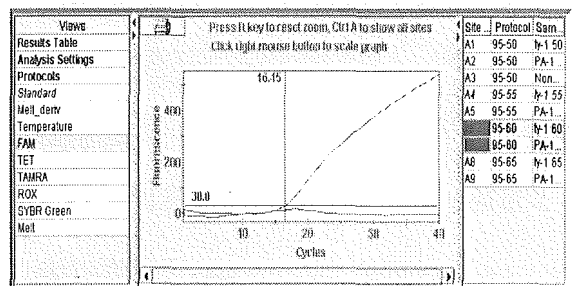
Smart Cycler では 4 種類の波長を同時に測定するので、蛍光色素を変えれば 4 種類までのマルチプレックス PCR ができる。他の機種との互換性を考えて FAM-TAMRA のプローブを使用していたが、VIC-TAMRA のプローブを製作し、マルチプレックス PCR を試みた。チフス菌の Vi 抗原合成関連遺伝子 *vipR* を検出するプローブを FAM-TAMRA 標識し、O2 血清型サルモネラに特異的な *tyv* を検出するプローブを VIC-TAMRA 標識した。図 10 に結果を示す。それぞれ異なる波長でシグナルが観察された。

D. 考察

1) 広範囲の菌を対象とする PCR

16S または 23S リボゾームを標的とした PCR は、バチルス属など一部の菌は検出されにくい。しかし、増幅産物のサイズはほとんど同じで、HMA 法を用いても種の推定には不十分であった。シーケンサーを利用できる機関ではダイレクトシーケンシングを行えば種の推定は可能と考えられる。試料中の物質による PCR の効率チェックには利用可能と考えられた。将来 DNA チップ

A) FAM 蛍光強度



B) TET 蛍光強度

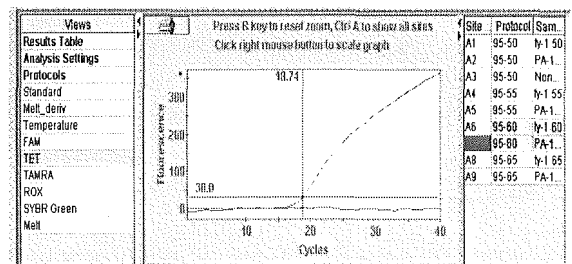


図 10 異なる蛍光標識 probe を用いたチフス菌・パラチフス菌同時検出用マルチプレックスリアルタイム PCR *viaR* 及び *tyv* を標的として、FAM 標識または VIC 標識 (TET の波長で検出される) した probe を使用して、TaqMan ケミストリでリアルタイム PCR を行った

法が普及すれば、数百の遺伝子または配列を一度に試験することが可能になるため、それまでデータを蓄積しておくのが重要と考えられる。

また、16S-23S のスペーサー領域を標的とした PCR では種によりパターンとその多様性に差があり、菌種の推定を行える可能性はみられた。河川から分離した菌株の解析では、いくつかの例外があり、また例数も少ないため追加実験が必要であるが、かなりよく一致していた。

さらに多くの菌種と株数を調査し、1次元電気泳動の解析ソフトを導入しデータベース化すれば、将来実用化できるかもしれない。しかし、現時点での導入は実用的ではない。

2) 菌種特異的な PCR

各菌種に特異的な染色体上の遺伝子を標的としたスクリーニングと確認用の PCR により本研究で対象とした菌種は診断が可能である。さらに、出血性大腸菌は O157:H7 か他の血清型かは追加の試験をする。そのためのプライマーの候補は「プライマーとプローブ一覧」に載せた。赤痢菌は病原性プラスミドを試験する必要がある。しかし、赤痢菌と侵入性大腸菌は同じ病原機構を持ち、細菌学的には同じ菌のため、現時点では両者を区別するための遺伝子試験法は報告されていない。すべてのプライマーを混合したマルチプレックス PCR にはさらに工夫が必要とされる。

実際の検査を担う地方衛生研究所には PCR を行う態勢が整備されていることから、現時点ではこの方法が最も実用に適していると思われる。他の菌との鑑別が必要な菌種もあるので、菌培養を合わせて行うのがベストと考えられる。

3) リアルタイム PCR

イ) 炭疽菌

TaqMan probe ケミストリを採用して、特異性が高く、迅速な炭疽菌のスクリーニング及び確認用のリアルタイム PCR を開発した。リアルタイム PCR はおよそ 30 分で結果が得られる。また、段階希釈法では検出感度はチューブあたり 1 個の菌を検出した。試料量を 10 μ l 使えば 100 個/ml、80 μ l ではおよそ 10 個/ml の試料から菌を検出できる計算となる。本法は PCR を行った後反応液をピペット等で扱う必要がなく、そのためコンタミネーションの危険性が低くなる。

ロ) そのほかの菌のリアルタイム PCR

リアルタイム PCR を用いた診断では、陽性になった時点で菌種の推定ができるようにした。*ipaH* を標的とした赤痢菌の検出感度はチューブあたり 0.5 個で、試料として 500 個/ml から検出できた。

蛍光色素を変えた 2 種類の遺伝子を検出するマルチプレックス PCR を開発した。Smart Cycler では 4 種類の波長を同時に測定するので、あと 2 種類の遺伝子を追加できる。現在わが国では、波長の長い蛍光を吸収するクエンチャー標識の受託合成サービスが普及していないが、将

来、4種類の遺伝子を検出するマルチプレックス PCR が開発できよう。

多くの地方衛生研究所に、リアルタイム PCR が設置されつつあるが、まだ稼働率は低いようである。各地方衛生研究所・検疫所・病院検査室などで、大いに役に立つと予想されるので、保健医療科学院の平成 14 年度の新興再興感染症研修においてリアルタイム PCR を導入し、普及を図った。リアルタイム PCR は機械によって、使用できる蛍光やプローブの種類が異なり、TaqDNA ポリメラーゼも機種専用のものが出ていて一様ではない。速やかに標準化の事業を行う必要がある。

4) 炭疽菌類似菌の分布について

土壌中にはバチルス属が多く生息し、それらの生態や正常には不明の点が多い。1997 年にフランスで発生した炭疽に関して、周辺の土壌調査を行ったところ、炭疽菌に特異的とされていた配列が多くの土壌菌に分布していたと報告された。本研究においても、河川で分離した類似菌に *sap* を保有する株が存在していた。また、データは載せなかったが、上水に近い処理水の濃縮液 2 件を、リアルタイム PCR で調べたところ、両方とも量は少ないが陽性となった。以

上のことから、本菌の検査体制を構築するために、環境や原水の調査が早急に求められる。

E. 結論

各菌種に特異的な染色体上の遺伝子を標的としたスクリーニングと確認用の PCR により、炭疽菌・ペスト菌・赤痢菌・チフス菌・パラチフス菌・コレラ菌・出血性大腸菌の診断が可能である。実際の検査を担う地方衛生研究所には PCR を行う態勢が整備されていることから、現時点ではこの方法が最も実用に適していると思われる。他の菌との鑑別が必要な菌種もあるので、菌培養を合わせて行うのがベストと考えられる。

特異性が高く・迅速・高感度な、炭疽菌のスクリーニングと確認用及びペスト菌・赤痢菌・チフス菌・パラチフス菌診断用のリアルタイム PCR を開発した。本法は各地方衛生研究所・検疫所・病院検査室などで大いに役に立つと予想されるが、標準化を行う必要がある。

広範囲の菌を対象とする PCR は、菌種の推定を行える可能性は得られたが、現時点では実用的ではない。さらに多くの菌種と株数を調査し、1 次元電気泳動の解析ソフトを導入しデー

データベース化など研究が必要とされる。

炭疽菌の検査体制を遂行するために、環境や
原水の事前調査が必須である。

F. 文献

1) Ganguly, A., M. J. Rock and D. J. Prockop. 1993. Conformation- sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-strand PCR products and DNA fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:10325- 10329.

G. 発表業績

1) Hirose K., Ito K., et al : Selective amplification of *tyv(rfbE)*, *prt(rfbS)*, *viaB* and *fliC* genes by mutiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovar Typhi, and Paratyphi A. J. Clin.Microbiol.2002, 40(2):633-636.

2) 伊藤健一郎、松崎充宏 : 腸管出血性大腸菌0157の迅速検査法とその成績の取り扱い. 日本臨床. 2002, 60(6) : 1114-1120.

プライマー及びプローブ一覧

○印はスクリーニング PCR に使用した primer

primer または probe 名	5' - 配列 - 3'	長さ
PCR	PCR の primer の組み合わせ (アニーリング温度)	
R-PCR	リアルタイム PCR の primer と probe の組み合わせ (アニーリング温度)	
文献番号がないものは本研究で作製または未発表		

炭疽菌

カプセル (プラスミド)

1234 (capwhos)	ctgagccattaatcgatatg	20bp ⁱ	
1301 (capwhoas)	tcccacttacgtaatctgag	20bp ⁱ	
M011 (Makino)	gacggattatggtgctaag	19bp ⁱⁱ	
M012 (Makino)	gcactggcaactggttttg	19bp ⁱⁱ	
capks	caccatccgcatgtacttca	20bp	
cap_probe	5'-FAM-tgtgtttgaccaaggatggacaaga-TAMRA-3'		25bp

PCR 1234/1301=847bp (55°C)
M011/M012=591bp (60°C)
R-PCR capks/M012=206bp+cap_probe (60°C)

毒素 (防御抗原) (プラスミド)

PA5 (WHO)	tcctaacactaacgaagtgcg	20bp ⁱ	
PA8 (WHO)	gaggtagaaggatatacggt	20bp ⁱ	
PA75' (Pag_s)	atcaccagaggcaagacaccc	21bp ⁱⁱ	
PA65' (Pag_as)	accaatatcaaagaacgacgc	20bp ⁱⁱ	
PA_probe	5'-FAM-tgtggcagcttatccgattgtacatg-TAMRA-3'		26bp

PCR PA5/PA8=597bp (55°C)
PA75' /PA65' =211bp (60°C)
R-PCR PA75' /PA65' =211bp+PA_probe (60°C)

表面タンパク (染色体)

○slayerwho_s	cgcgtttctatggcatctcttct	23bp ⁱ	
○slayerwho_as	ttctgaagctggcgttacaaat	22bp ⁱ	
Ba_sapks	cgtttctatggcatctcttc	20bp	
Ba_sapkas2	gctcccattgatcacca	17bp	
Ba_sapk_probe	5'-FAM-cggtactccagcaactaaattcaaa-TAMRA-3'		25bp

PCR slayerwo_s/slayerwho_as=639bp (53°C)