

ナル抗体を作製した。ヘルペスウイルス一般の感染様式として、ウイルスが細胞内で増殖し、細胞を溶解させる型をとる細胞溶解性（増殖性）感染（lytic infection）と、ウイルスが潜在したままで細胞内のウイルス増殖のみられない潜伏感染（latent infection）の2つの感染様式が存在する。HHV-8にもlytic と latent の2型が存在し、phorbol esterで刺激したHHV-8感染細胞株TY-1を用いたウエスタンブロッティングの結果ではK2, およびORF26, K8, K8.1, K10, K11, ORF59, ORF65タンパクは増殖感染関連タンパクで、ORF73タンパク（latency-associated nuclear antigen, LANAとも呼ばれる）は潜伏感染関連タンパクであることが示唆された。HHV-8感染原発性体腔液性リンパ腫細胞株ではphorbol esterの刺激の有無に関わらず、全ての細胞にLANAの高発現が見られた。

つぎに、これらの抗体を用いてエイズ合併カポジ肉腫および非エイズ合併カポジ肉腫の計25例の生検および剖検組織標本を染色した。その結果、増殖感染関連タンパクはいずれも発現がきわめてまれであったのに対し、潜伏感染関連タンパクLANAはほとんど全てのカポジ肉腫紡錘型腫瘍細胞の核内に点状に発現していることがほぼ全例において確認された。一方で血管腫、血管肉腫、癭痕、肉芽組織など組織学的にカポジ肉腫に類似する疾患や正常な皮膚組織、他の癌組織などには特異的なシグナルは認められなかった。この結果はHHV-8がカポジ肉腫の紡錘型腫瘍細胞に特異的に感染していることを示しており、その感染様式は潜伏感染状態であることが示唆される。さらに、複数の多巣性キャッスルマン病の生検標本にこの検査を施行したところ、エイズに合併した多巣性キャッスルマン病のリンパ節に多くのHHV-8陽性細胞を認め、かつ増殖感染に特徴的ウイルス蛋白が検出された。したがって、多巣性キャッスルマン病ではカポジ肉腫や原発性体腔液性リンパ腫とことなる病態が考えられた。これらの結果はここで開発された抗LANA抗体が病理組織検体におけるHHV-8の検出にきわめて有用なものであることを示している。

## D. 考察

新規にウイルスなどの病原体が発見され、それが悪性腫瘍などの生命に関わる疾患の発症に関連している可能性がある場合、その病原体がどの個体に、どれだけ感染しているかを知ることがその感染症を把握する上で最も重要な要因となる。本研究ではHHV-8の感染細胞株樹立から血清抗体検出系の確立、抗体の作成、病理組織学的検出法の確立が行われた。HHV-8のように新規の病原体に関してはその感染機構や様式が明らかでなく、どの検査法がもっとも適しているかがわからない。したがってこのような感染症検査においては複数の検査法を立ち上げ、結果を比較することが必要となる。事実、HHV-8の血清検査ではELISAとIFAの結果が異なるケースがあることがすでに報告されている。本研究においてもカポジ肉腫患者間で血清抗体の抗体価が大きく異なることが分かっている。また、免疫組織染色においても、カポジ肉腫症例間で、LANAの発現はだいたい一定しているものの、他の増殖関連蛋白の発現は症例によりかなり異なることが分かった。個人差や、異なる病期ではウイルス量、抗体価、感染細胞数が異なることが予想され、複数の検査データを得ることがきわめて重要であることが痛感された。結果的にはHHV-8感染は日本人においては希であることがわかったが、ここで用いられた手法は今後の新興感染症の解析のために維持、発展させておく必要があるものと考えられる。また、これら研究は患者検体から感染細胞株が樹立されたことが大きなきっかけとなった。HHV-8は日本人にはまれなウイルスであるだけに症例数が少なく、わずかな機会を確実にものにする努力が必要で、今後も新たな感染症を疑う特殊な症例に関しては臨床医と病理医がよく連携し希少な検体を有効に使うための手段や手続きを考慮しておく必要がある。

本研究で明らかになったとおり、HHV-8感染は日本ではまれであり、ほとんどの感染者は無症候である。しかし、カポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病の発症との関連はかなり明瞭なものであり、今後、このウイルスとこれら疾患の病因との関わり、感染経路の解明などがなされていくものと思われる。

## E. 結論

新規に発見されたHHV-8につき感染細胞からウイルスの抗原蛋白を同定し血清抗体検出法を確立、日本人における感染率を明らかにした。また、このウイルスに対するウサギポリクローナル抗体を作成し、組織における感染細胞の同定に成功した。ここで確立された手法は新たに発見された病原体に対する診断法確立のモデルとなるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Foreman, K.E., Friborg, J., Chandran, B., Katano, H., Sata, T., Mercader, M., Nabel, G.J. and Nickoloff, B.J. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci* 26, 182-93., 2001
2. Dilnur, P., Katano, H., Wang, Z.H., Kudo, M., Osakabe, Y., Sata, T. and Ebihara, Y. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China. *Pathol Int* 51, 845-852, 2001
3. Nuvor, S.V., Katano, H., Ampofo, W.K., Barnor, J.S. and Sata, T. Higher prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in HIV-infected individuals than in the general population in Ghana, West Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 362-4., 2001
4. Katano, H., Sato, Y. and Sata, T. Expression of p53 and human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen (LANA) with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* 92:3076-84, 2001
5. Sakurada, S., Katano, H., Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S. Effective human herpesvirus 8

infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. *J Virol* 75, 7717-22., 2001

6. Sato-Matsumura, K.C., Matsumura, T., Nabeshima, M., Katano, H., Sata, T. and Koizumi, H. Serological and immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 in Kaposi's sarcoma after immunosuppressive therapy for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 145;633-7, 2001
7. Satoh, M., Toma, H., Sato, Y., Futenma, C., Kiyuna, S., Shiroma, Y., Kokaze, A., Sakurada, S., Sata, T. and Katano, H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 54, 125-6., 2001
8. Shimizu, S., Katano, H., Sata, T., Chen, K.R., Tagami, H., Hanabusa, H. and Shimizu, H. Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection. *Arch Dermatol Res* 293, 380-1., 2001
9. Katano, H., Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T. and Sata, T. Human-Herpesvirus-8-Encoded K8 Protein Colocalizes with the Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Bodies and Recruits p53 to the PML Bodies. *Virology* 286, 446-55., 2001
10. Suda, T., Katano, H., Delsol, G., Kakiuchi, C., Nakamura, T., Shiota, M., Sata, T., Higshihara, M. and Mori, S. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated Multicentric Castlemans Diseases. *Pathol Int* 51;671-9, 2001
11. Katano, H., Sato, Y., Itoh, H. and Sata, T. Expression of human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded immediate early protein, open reading frame 50, in HHV-8-associated diseases. *J Hum Virol* 4, 96-102., 2001

### 2. 学会発表

片野晴隆、佐藤由子、伊東秀記、佐多徹

太郎 HHV-8関連疾患における前初期  
タンパクORF50の発現について：第16  
回ヘルペスウイルス研究会。大阪 2001.  
10.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし。

## 15. 通常の細菌学的同定検査により同定不能な菌種の 同定法に関する検討

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所細菌・血液製剤部長  
研究協力者 柴田 尚宏、土井 洋平、柴山 恵吾、黒川 博史  
(国立感染症研究所細菌・血液製剤部)

**研究要旨** 臨床現場では、アミノ酸や糖の分解性、ガス産生性、運動性などが細菌の同定検査の基本的指標として用いられており、これらにより大半の菌種の同定が可能となっている。しかし、本同定法では、属までしか同定できない菌株や「同定不能」と処理されている臨床分離株も少なくない。そこで、本研究では、国内の医療施設で患者の血液などから分離された菌株について、細菌の菌種に特異的な遺伝子例えば、16S rRNA遺伝子やDNA polymerase遺伝子の塩基配列から菌種を特定し、同定困難菌の同定を行う方法を検討した。対象菌種としては、非結核性抗酸菌群、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌属、*Enterococcus*属、*Bartonella*属、*Streptobacillus*属、*Campylobacter*属などを想定しその実用性を検討した。

その結果、テイコプラニンに中等度耐性(MIC, 16  $\mu$ g/ml)を示した *Staphylococcus capitis*、ネズミ咬傷後の敗血症患者の血液から分離された *Streptobacillus moniliformis*、バンコマイシンに高度耐性(MIC, >128  $\mu$ g/ml)を示す *Enterococcus raffinosus* など通常の同定検査法では菌種の同定が困難な希少な菌種が同定された。

### A. 研究目的

細菌感染症の病原体を同定するため、様々な方法が用いられている。現在、一般の医療施設の細菌検査室などで実施されている、その代表的な検査は、古典的な手法に基づくものであり、例えばアミノ酸や糖の分解性、運動性、ガス産生性、有機酸の炭素源としての利用能などである。

しかし、これらの同定検査法は、属までの同定には有力な力を発揮するものの、最近、細分化されつつある菌種の同定には十分に対応することはできない場合も多く、属までの同定や「同定不能」菌として処理されている場合が多い。

そこで、詳しい菌種の同定を行う為、データベースに蓄積されつつある16S rRNAや23S rRNA、DNA gyraseなど細菌の生育に重要不可欠で、かつ同一菌種間で高い相同性が保持

されている遺伝子について解析を行い、それによる菌種の同定法の信頼性などを実際の臨床分離株を用いて検討した。

### B. 研究方法

- a. 16S rRNAの菌種特異的領域を検出するPCRプライマーの設計

図1に示す16S rRNAのシーケンスの中には、属を越えて保存されている領域と、菌種毎に特徴的な配列を示す領域がある。そこで、前者に相当する領域にPCRプライマーを設定し、その間の可変領域を増幅した。この場合、以下の3種類の領域を増幅し、データベースとの照合を行なった。

16S rRNA増幅用PCRプライマーセット  
 プライマーセット1  
 10F: 5'-gtttgatcctggctca-3'  
 800R: 5'-taccagggtatctaacc-3'  
 プライマーセット2  
 525F: 5'-gtgccagcagccgcggta-3'  
 1050R: 5'-cacgagctgacgac-3'  
 プライマーセット3  
 800F: 5'-ggattagataccctggta-3'  
 1500R: 5'-tacctgttacgactt-3'

#### b. DNAの抽出とPCR条件

10の5乗CFU/ml程度の培養菌液1.0mlをマイクロ遠心チューブに入れ、3分間遠沈した後、ペレットを200 $\mu$ lの滅菌精製水に懸濁し98 $^{\circ}$ C5分加熱処理しDNAを細胞から溶出させ、再度3分間遠沈しテンプレートDNA溶液を作成した。このDNA試料液を用いて、表1に示す組成のPCR反応バッファーと、表2に示すPCRのサイクル条件で16S rRNAの領域を増幅した。

#### c. シークエンス解析

得られた各々のPCR産物について自動DNAシークエンサー（3100 Genetic Analyzer；アプライドバイオシステムズ社製）を用い、ダイデオキシターミネータ法により塩基配列を決定した。

#### d. データベースとの照合

得られた塩基配列をQuery配列として、国立遺伝学研究所のDNAデータ解析プログラムFASTA法を用いてホモロジー検索を行った。照合結果の一例を図2に示す。

#### e. 菌種の特定

3ヵ所の塩基配列について各々データベース照合を行い、ランクの高いものを比較しつつ菌種の推定または特定を行った。

### C. 研究結果

未同定または同定困難株として16S rRNAの解析により菌種を推定ないし特定できた菌種・菌株は、

- 1) *Enterococcus raffinosus* (VCM耐性株)
- 2) *Actinomyces israelii* (敗血症患者由来株)
- 3) *Myroides odoratus* (術創感染症由来株)

- 4) *Chryseobacterium indrogenes*  
(患者喀痰由来IPM耐性株)
  - 5) *Chryseobacterium meningosepticum*  
(髄膜炎患者由来IPM耐性株)
  - 6) *Streptobacillus moniliformis*  
(鼠咬症後の敗血症患者由来株)
  - 7) *Pseudomonas putida* (IPM耐性株)
  - 8) *Stenotrophomonas maltophilia*
  - 9) *Streptococcus capitis*  
(テイコプラニン低感受性株)
- であった。

### D. 考察

PCRにより16S rRNA領域を増幅し、そのDNAシークエンスをDNAデータベースと照合して菌種を推定する本試験法は、所期の目的を概ね達成する事が可能であることが確認された。しかし、本試験法では、例えば、*Staphylococcus capitis*と近縁の*Staph. caprae*を判別するには、生化学性状を併せて検討する必要がある、16S rRNAの解析のみから全ての菌種を特定する事は困難な事も事実であった。今回は検討できなかったが、DNA gyraseなど他の遺伝子の解析結果を重ね合わせて検討しなければならない菌種も存在する事は事実であり、本試験法の改善を検討中である。

血液培養などの試験試料のグラム染色などで菌が観察されるものの、DNAの抽出が困難であったり、血清中のPCR阻害物質の影響などにより期待される成果が上げられなかった例もみられる。現在、市販のDNA抽出キットや文献的に報告されている様々な方法を検討し、血液や体液の混入したサンプルからのテンプレートDNAの抽出条件やPCRの至適条件を検討している。例えば、国内の医療施設から敗血症の患者で菌分離が困難であるものの、菌体が沈澱物中に観察される試料について、菌種の特定を進めており、来年度の研究成果の中でその結果を報告する予定である。

本同定検査法は、従来の同定法により菌種の同定が難しい菌株についても、菌種を推定ないし特定する事がある程度可能であり、実用上有用である事が確認された。しかし、一般の細菌検査室などにおいて常時、実施することは、手間やコストの面で無理があるものの、感染症危機管理などの観点から、地方衛生研究所や国立感染症研究所などの後方支援研究施設における特殊検査として確立し技術を温存する必要がある。

## E. 結論

現行の細菌同定検査法により菌種の特特定が困難な細菌の菌種において、全ての細菌が保有し、しかも菌種特異的に保存されている16S rRNAのシーケンスを解析し、DNAデータベースと照合することで、菌種の推定や特定を行うことが実用的に可能である事が確認された。

しかし、生物学的に極めて近縁の関係にある菌種においては、本試験法でも菌種を識別することが困難な場合もあり、他の遺伝子の解析データや従来の生化学的同定法を併せて検討する必要がある株も少なからず存在した。

また、血液や体液などの混入するサンプルではPCR増幅が失敗する例も多く、テンプレートDNAの調製方法について改良の余地が多く残されている。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

投稿準備中。

### 2. 学会発表

準備中。

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 PCR反応系

滅菌精製水	30 $\mu$ l
10×PCRバッファー	5 $\mu$ l
dNTP mixture	4 $\mu$ l
PCRプライマー1	0.5 $\mu$ l
PCRプライマー2	0.5 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	0.25 $\mu$ l
DNA テンプレート	10 $\mu$ l
計	50 $\mu$ l

表2 PCRサイクル

変成	93-95°C	2分	
変成	93-95°C	1分	25-35 サイクル
アニーリング	51-55°C	1分	
鎖延長反応	71-73°C	1.5分	
最終鎖延長反応	71-73°C	1.5分	

図1. 16S rRNAのシーケンス例 (*Escherichia coli* K12) と各PCRプライマーの設定位置

```

1          aa ttgaagagtt tgatcatggc tcagattgaa cgctggcggc
                                     10F
aggcctaaca catgcaagtc gaacggtaac aggaagaagc ttgcttcttt gctgacgagt
ggcggacggg tgagtaatgt ctgggaaact gcctgatgga gggggataac tactggaaac
ggtagcctaat accgcataac gtcgcaagac caaagagggg gaccttcggg cctcttgcca
tcggatgtgc ccagatggga ttagctagta ggtggggtaa cggctcacct aggcgacgat
ccctagctgg tctgagagga tgaccagcca cactggaact gagacacggg ccagactcct
acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgcaa gcctgatgca gccatgccgc
gtgtatgaag aaggccttcg ggttgtaaag tactttcagc ggggaggaag ggagtaaagt
463 taataccttt gctcattgac gttaccgca gaagaagcac cggctaactc cgtgccagca
                                     525F

523 gccgcggtaa tacggagggt gcaagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgcacgca
ggcggtttgt taagtcagat gtgaaatccc cgggctcaac ctgggaactg catctgatac
tggcaagctt gagtctcgta gaggggggta gaattccagg ttagcgggtg aatgocgtag
agatctggag gaataccggt ggogaaggcg gccccctgga cgaagactga cgtcagggtg
763 cgaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgcogt aaacgatgtc
                                     800R & 800F

gacttggagg ttgtgccctt gaggcgtggc ttccggagct aacgogttaa gtcgaccgcc
tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccc cacaagcggg
ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctggtcttg acatccacgg
aagttttcag agatgagaat gtgccttcgg gaaccgtgag acagggtgctg catggctgtc
1063 gtcagctcgt gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcgaacc cttatccttt
                                     1050R

gttgccagcg gtccggccgg gaactcaaag gagactgcca gtgataaact ggaggaaggt
ggggatgacg tcaagtcatc atggccctta cgaccagggc tacacacgtg ctacaatggc
gcatacaaaag agaagcgacc tcgcgagagc aagcggacct cataaagtgc gtcgtagtcc
ggattggagt ctgcaactcg actccatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg tggatcagaa
tgccacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtggg
ttgcaaaaga agtaggtagc ttaaccttcg ggagggcgct taccactttg tgattcatga
1483 ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtaaccgta ggggaacctg cggttggatc acctcctta
                                     1500R

```

図2. 血液培養で分離された菌 (*Streptobacillus miniliformis*) のFASTAによる識別例

```

FASTA (3.28 September 2001) function [optimized, +5/-4 matrix (5:-4)] ktup: 6
join: 50, opt: 35, gap-pen: -16/-4, width: 16
Scan time: 1541.820
The best scores are:          initn initl opt z-sc E(929451)
Z35305|Z35305.1 S.moniliformis (ATCC (1485) [f] 996 996 2166 2101.2 1e-109
Z35304|Z35304.1 S.moniliformis (AHL 3 (1485) [f] 935 935 2042 1980.3 5.4e-103
X83517|X83517.1 Bacterial sp. AVG 211 (1451) [f] 1528 1006 1620 1569.3 4.3e-80
AJ289180|AJ289180.1 uncultured eubact (1378) [f] 1346 1035 1591 1541.3 1.7e-78
L37789|L37789.1 Leptotrichia sanguine (1462) [f] 1165 1165 1590 1540.0 1.8e-78
AF287808|AF287808.1 Leptotrichia-like (1408) [f] 1319 1008 1582 1532.4 5.1e-78
AJ289183|AJ289183.1 uncultured eubact (1413) [f] 1305 512 1577 1527.5 9.4e-78
L37788|L37788.1 Leptotrichia buccalis (1468) [f] 1387 1062 1548 1499.0 3.5e-76
AF189244|AF189244.1 Leptotrichia sp. (1506) [f] 1434 1083 1531 1482.3 2.9e-75
AF287813|AF287813.1 Leptotrichia sp. (1447) [f] 1337 1050 1521 1472.8 1e-74
M58685|M58685.1 Fusobacterium simiae (1468) [f] 1284 956 1519 1470.8 1.3e-74
M58678|M58678.1 Bacteroides termitidi (1515) [f] 1286 1033 1518 1469.6 1.5e-74

>>Z35305|Z35305.1 S.moniliformis (ATCC 14647, Type strai (1485 nt)
  initn: 996 initl: 996 opt: 2166 Z-score: 2101.2 expect() 1e-109
  99.111% identity in 450 nt overlap (1-448:62-509)
                                     10      20      30
                                     ATGAAATGTAAGCTTGCCTTACATAGACTAC
                                     ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 ACAGAAATGCTTAACACATGCCAAATCTATGTATGAAATGTAAGCTTGCCTTACATAGACTAC
      40      50      60      70      80      90
                                     40      50      60      70      80
                                     ATGGTGGACTGGTGAGTAACGIGTAAAGAACTTACCTCTTAGACTGGGATAAACCATTA-G
                                     ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 ATGGTGGACTGGTGAGTAACGIGTAAAGAACTTACCTCTTAGACTGGGATAAACCATTAGG
      100     110     120     130     140     150
                                     90      100     110     120     130     140
                                     AAATGATGGATAAATACTAGATATTATTAGTAGTAGGCATCTACTATTAATGAAAGGAGAG
                                     ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 AAATGATGGATAAATACTAGATATTATTAGTAGTAGGCATCTACTATTAATGAAAGGAGAG
      160     170     180     190     200     210
                                     150     160     170     180     190     200
                                     ATTGCTAAGAGAGAGCTTTGCATCCTATTAGCTAGTITGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG
                                     ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 ATTGCTAAGAGAGAGCTTTGCATCCTATTAGCTAGTITGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG
      220     230     240     250     260     270

```



別箇所のシーケンスデータによる検索結果の例

FASTA (3.28 September 2001) function [optimized, +/-4 matrix (5:-4)] ktup: 6  
 join: 50, opt: 35, gap-pen: -16/ -4, width: 16  
 Scan time: 1506.280

The best scores are:                    initn init1 opt z-sc E(929126)  
 Z35305|Z35305.1 S.moniliformis (ATCC (1485) [r] 2100 2100 2100 2155.0 1e-112  
 Z35304|Z35304.1 S.moniliformis (AHL 3 (1485) [r] 2082 2082 2082 2136.4 1.1e-111  
 AJ289180|AJ289180.1 uncultured eubact (1378) [r] 1929 1929 1929 1978.9 6.9e-103  
 AF287808|AF287808.1 Leptotrichia-like (1408) [r] 1920 1920 1920 1969.5 2.3e-102  
 AF287807|AF287807.1 Leptotrichia-like (1504) [r] 1915 1915 1915 1964.0 4.3e-102  
 L37789|L37789.1 Leptotrichia sanguine (1462) [r] 1901 1901 1902 1950.8 2.4e-101  
 AJ289183|AJ289183.1 uncultured eubact (1413) [r] 1886 1426 1897 1945.8 4.7e-101  
 M58678|M58678.1 Bacteroides termitidi (1515) [r] 1761 1761 1767 1811.3 1.4e-93  
 AY008309|AY008309.1 Leptotrichia sp. (1466) [r] 1756 1756 1758 1802.2 4.5e-93  
 L37788|L37788.1 Leptotrichia buccalis (1468) [r] 1732 1732 1737 1780.5 7.3e-92  
 X83517|X83517.1 Bacterial sp. AVG 211 (1451) [r] 1691 694 1737 1780.6 7.3e-92  
 AF287811|AF287811.1 Leptotrichia sp. (1503) [r] 1720 1720 1722 1764.9 5.3e-91  
 AF201978|AF201978.1 Human oral bacter (1370) [r] 1717 1717 1719 1762.3 8.1e-91  
 AF189244|AF189244.1 Leptotrichia sp. (1506) [r] 1711 1711 1713 1755.6 1.7e-90

>>Z35305|Z35305.1 S.moniliformis (ATCC 14647, Type strain (1485 nt)  
 rev-comp initn: 2100 init1: 2100 opt: 2100 Z-score: 2155.0 expect() 1e-112  
 100.000% identity in 420 nt overlap (420-1:301-720)

```

                                     420      410      400
-                                     ACGGCCACAAGGGGACTGAGATACGGCCCT
                                     ::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 GCTATGATAGGTAGCCGGCCCCGAGAGGTGAACGGGCCACAAGGGGACTGAGATACGGCCCT
          280      290      300      310      320      330

          390      380      370      360      350      340
-          TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGAGGAAACTCTGATCCAGCA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 TACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGAGGAAACTCTGATCCAGCA
          340      350      360      370      380      390

          330      320      310      300      290      280
-          ATTCTGTGTGCACGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGTGCTTTTCAGTAGGGAAGAAGAAG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 ATTCTGTGTGCACGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGTGCTTTTCAGTAGGGAAGAAGAAG
          400      410      420      430      440      450

          270      260      250      240      230      220
-          ATGACGGTACCTACAGAAGAAGCGACGGCTAAAATACGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATACGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Z35305 ATGACGGTACCTACAGAAGAAGCGACGGCTAAAATACGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATACGT
          460      470      480      490      500      510
  
```

## 16. 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 症の血清診断法の標準化及びその普及

分担研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部原生動物室長
研究協力者	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所 細菌病理部
	荒木 国興	東京医科歯科大学 非常勤講師

**研究要旨** アメーバ赤痢の診断に際しては*Entamoeba histolytica*と形態的同種である*E. dispar*との鑑別診断が重要である。我が国では検便による虫体の検出が広く用いられているが、検便では「病原種 / 非病原種」の鑑別診断には至らず、血清抗体価またはPCRによる特定の遺伝子配列の増幅・検出などの補助的確認が求められている。ELISA法はすでに多くの疾病の検査方法として普及しているもので、アメーバ赤痢の診断にも採用されるべき方法と考えられることから、本研究事業においてアメーバ赤痢診断に向けたELISA法の条件設定を行った。すなわち、赤痢アメーバの大量培養による抗原作製、反応系における抗原至適濃度の検討、カット・オフ値の選択など、試験条件の至適化を行った。試験方法の普及に向けては抗原および陽性血清の入手が必須要件で、今後は医療機関の協力を得たいと考えている。また、ELISAの特徴として、抗原を換えることで多くの疾患の血清診断として適用することができることから、赤痢アメーバにとどまらず水系感染の原虫類として注目されるクリプトスポリジウム、ジアルジア、サイクロスポラ、イソスポラ、トキソプラズマ等々の抗原を順次供給することを本研究事業の構想に加えている。

### A. 研究目的

いわゆる「感染症法」に基づくアメーバ赤痢とは赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の感染に起因する疾患で、いわゆる腸管アメーバ症（アメーバ赤痢）と腸管外アメーバ症の両方を指している。本症に関するWHOの指針によれば、*E. histolytica*と形態的同種である*E. dispar*（非病原種）感染に対しての治療は不適当とされており両者の鑑別診断が必須とされている。我が国では、アメーバ赤痢の診断方法として主に検便が用いられており、鑑別診断のためには血清抗体価またはPCRによる特定の遺伝子配列の増幅・検出などによる補助的確認が必要となっている。

ELISA法は各種疾病の診断法として普及した

免疫検査法であり、アメーバ赤痢の診断法として適用すべき検査方法と考えられる。ところが、わが国では市販の抗体検査試薬の入手が困難な状況にある。「感染症法」で定めるアメーバ赤痢患者の全数把握の精度向上に向けて、是非とも鑑別診断法の確立と普及を促す必要があるものと考えられる。本研究事業では抗原の供給体制の確立とELISA反応の条件設定を検討した。また、本研究事業においては、赤痢アメーバにとどまらず、水系感染の原虫類として注目されるクリプトスポリジウム、ジアルジア、サイクロスポラ、イソスポラ、トキソプラズマ等々の血清反応用抗原を順次用意し、供給することを研究構想に加えている。

## B. 研究方法

### 材料および方法

#### 赤痢アメーバの培養

抗原調整用として赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* /HK-9 株 (ATCC 30015) を用いた。原虫は10mlのTYI-S培地 (ATCC1141) を用いて13mlホウ酸ガラス試験管で密栓状態にし35℃、嫌氣的培養を行った。なおTYI-S培地の組成ならびに調整法は以下のとおりである。

- 1) TYI-S-33/ATCC 1141 Medium  
TYI Broth 87 ml  
Vitamin Mixture 18 3 ml  
Heat-inactivated Bovine Serum 10 ml  
Bovine (Adult) Serum is heat-inactivated at 56C for 3 hrs.
- 2) TYI Broth  
TYI Base Stock 77 ml  
Glucose Buffer Stock Soln.(10x) 10 ml  
L-Cysteine·HCl (Sigma C7880) 0.1 g  
Ascorbic acid 0.02 g  
Adjust pH at 6.8 with 1N NaOH and sterilized by filtration prior to use.
- 3) TYI Base Stock  
Trypticase peptone (BBL 211922) 20.0 g  
Yeast extract (BBL 211929) 10.0 g  
Ferric Ammonium Citrate (Sigma 5879) 22.8 mg  
Distilled Water 770.0 ml  
Sterilize by filtration and distribute in 77 ml aliquots to 100 ml screw-capped bottles. Stored at -20C until use.
- 4) 10x Glucose Buffer Stock  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g  
Glucose 10.0 g  
Distilled Water 100.0 ml

Sterilized by filtration and stored at 4C until use.

#### 抗原の調整

ほぼ単層に増殖した対数増殖期の栄養体を材料に用いた。栄養体から凍結溶解により抽出した可溶性蛋白質を抗原として調整した。以下にその方法を示す。

- 1) 培養上清を除去した後、試験管に氷水で冷却したPBSを8ml程度加えて栄養体を剥離する。剥離しにくい場合は試験管ごと氷冷する。
- 2) 試験管を転倒混和して栄養体を浮遊させ、4℃で遠心する (1,000xg、5分間)。
- 3) 上清を除去し冷却したPBSを5ml加え再浮遊後、10mlスピッツ管に移し、4℃で遠心する (1,000xg、5分間)。
- 4) 3) をもう一度繰返す。
- 5) 上清を除去し、栄養体をペレットのまま -80℃で凍結保存する。
- 6) 凍結保存試料を氷水中で溶解し、10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>の細胞を一つの試験管にまとめ、4℃にて遠心分離し上清を回収する。
- 7) 上清中の蛋白質濃度を吸光度計により測定する。

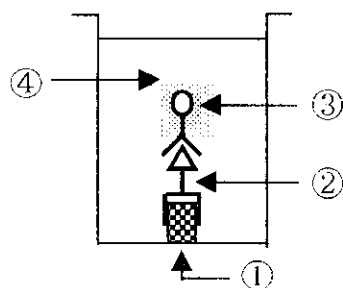
#### 被検血清

陽性群としてアメーバ症の確定された22名ならびに陰性対照群として原虫の感染が認められない非感染者40名の血清を用いた。

#### ELSIA (酵素免疫法) による抗体測定

血中の抗体を検出方法には多種あるが、本研究では多量検体処理に有用なマイクロプレートを利用したELISAを検討した。本法は抗原を吸着させたプレートに被検血清を加え、抗原と結合した抗体を、その抗体に対する抗体 (酵素標識されている) と反応させ検出することが基本となっている (図-1)。

図-1 ELISAの原理



- ① 抗原を吸着させる。
- ② 抗原に血清中の抗体を結合させる。
- ③ 抗原結合抗体に対する抗体 (酵素標識2次抗体) を結合させる。
- ④ 酵素反応で基質を発色させる。

## ELISA用試薬類の調整

### 1) 炭酸緩衝液

1M NaHCO <sub>3</sub>	43.3 ml
1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6.7 ml
NaN <sub>3</sub>	0.2 g
Distilled Water	950 ml

### 2) 洗浄液 (PBS/T)

0.15M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.500 ml
0.15M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500 ml
Tween20	5 ml
NaCl	68 g
Distilled Water	8,000 ml

### 3) 血清希釈液 (BSA/T)

BSA (SIGMA, Fraction V)	1 g
PBS/T	100 ml

### 4) 基質液 (発色液)

0.1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 ml
0.1M Citric acid	25 ml
ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid))	15 mg
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 $\mu$ l

## 方法

- 1) 抗原液を炭酸緩衝液で蛋白質濃度2~5  $\mu$ g/mlに調整し、マイクロプレートに100  $\mu$ l入れて37 $^{\circ}$ C、2時間抗原の吸着を行う。
- 2) 250  $\mu$ lの洗浄液 (PBS/T) で3回洗浄する。
- 3) 血清希釈液 (BSA/T) で200倍に希釈した血清を100  $\mu$ lずつプレートウェルに入れ、40分間反応させる (1次反応)。
- 4) 250  $\mu$ lの洗浄液 (PBS/T) で3回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
- 5) 抗ヒトIgG-horseradish peroxidase標

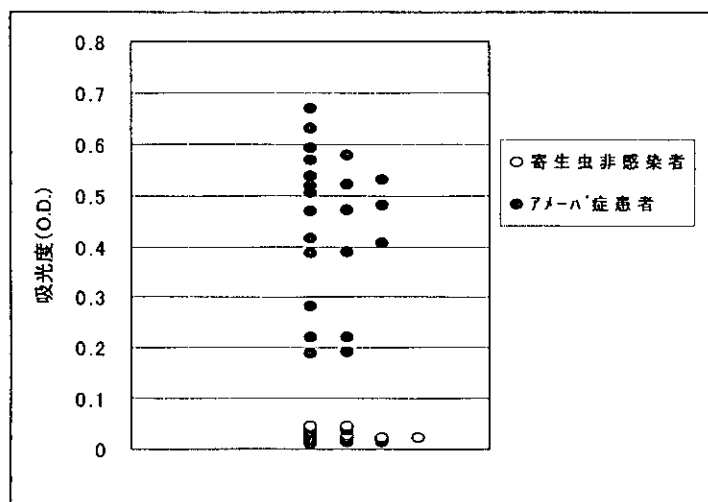
識抗体 (Cappel/Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG whole molecular) を血清希釈液で8,000~10,000倍に希釈し、100  $\mu$ lずつプレートウェルに入れ、40分間反応させる (2次反応)。

- 6) 250  $\mu$ lの洗浄液 (PBS/T) で3回洗浄する。ペーパータオルで充分水をきる。
- 7) 酵素基質液を100  $\mu$ lずつ入れ、室温で発色状態を観察する。7分後に1.25%ふっ化ナトリウムを50  $\mu$ l加え反応を停止する。波長414nmで吸光度 (O.D.) を測定する。

## C. 研究結果

寄生虫の感染が認められない非感染者40名とアメーバ症の確定された患者22名の血清中IgG抗体測定結果を図-2に示す。非感染者のO.D.値は0.016~0.045の範囲にあり、平均値および標準誤差 (SD) は0.025 $\pm$ 0.01であった。平均値+2SDは0.045となり、非感染者の測定値はすべて平均値+2SD以下となった。一方、アメーバ症患者のO.D.値は0.190~0.670の範囲にあり、平均値および標準誤差 (SD) は0.445 $\pm$ 0.145であった。アメーバ症患者の最小測定値0.190は非感染者の平均値+2SDである0.045を超えており、アメーバ症患者の測定値は非感染者のものより有意に高かった。陽性群 (アメーバ症患者) と陰性群 (非感染者) の2分割値であるカット・オフ値として0.1 (O.D.) を選択した場合、アメーバ症患者は100%陽性と判定された。このELISAによる定量的検査によれば、赤痢アメーバ感染を感度、特異性とも極めて高い診断率を得ることが可能であると期待される。

図-2 アメーバ感染者および寄生虫非感染者における抗アメーバIgG測定結果



## D & E. 考察および結論

今年度は血清疫学の中心的手法として抗原作製とELISA反応の至適化を検討した。上述の反応条件の設定により、ELISAはアメーバ赤痢の診断法として高感度でかつ迅速性や簡便性に優れた方法であることが示された。また、当該研究で用いた抗原はアメーバの大量培養により確保することができ、安定供給も可能であると考えられた。

従来、アメーバ赤痢の血清診断法は確立されたものであり、主に腸管外アメーバ症の診断方法に活用されてきたが、腸管アメーバ症においても*E. dispar*との鑑別診断に積極的に活用すべき検査法と考えている。本方法の普及はもっぱら抗原の供給に依存するものと考えられるが、その供給は現在の我が国の市場原理に馴染まず、市販の検査用試薬が入手困難な状況にある。したがって、当該研究事業等により供給の安定化を図るべきものとするが、今後は抗原の供給に関することがらとして、供給対象および供給方法について検討していく予定である。また、本方法は各種の消化管原虫症の診断方法として利用可能と考えられることから、クリプトスポリジウムを始めとする原虫類の抗原供給をあわせて検討したい。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

なし。

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

## 17. 細菌感染症・炭疽の診断法の標準化に関する研究

分担研究者 牧野 壮一 帯広畜産大学畜産学部助教授

**研究要旨** 一世紀以上前に世界で初めて分離・同定された病原体、炭疽菌は世界で恐れられてきた伝染病、炭疽の原因菌である。現在新興・再興感染症がクローズアップされている中で、炭疽菌は容易に大量の芽胞菌体として精製できるので、紛争が起こると常に生物兵器のための病原菌として恐れられてきた。即ち、人為的に起こりうる伝染病と言え。同時に、海外では動物やヒトでの自然発生も毎年数多く報告されている。この原因は炭疽菌芽胞による汚染常在地の存在による。わが国でもかつては発生が多く見られたので、炭疽常在地が多くあると考えられるので、人為的原因による発生も考慮して、炭疽に対する警戒および防疫上の対処は常に必要である。しかし、我が国は炭疽に対しては発生が無いことから無防備であるといえる。炭疽菌の迅速検出法は確立されつつあるが、今回のアメリカで起きた炭疽菌テロ騒動に引き続いて我国で起きた『白い粉騒動』では、炭疽菌に対する検査体制が国内で整備されていない現状が明らかにされた。炭疽菌自体の認知度の低さもさることながら、国内における迅速かつ確実、そして画一的な検査法が確立していないことが大きな原因であった。そこで、現在までの炭疽菌の検査に関わってきた基礎研究を応用して、迅速な診断キットを作製したので、その評価を行った。

### A. 研究目的

炭疽菌により起こる炭疽は、草食動物を中心とした家畜伝染病であるが、人を含めた他の動物にも重篤な症状を起こす人畜共通伝染病である。炭疽菌は、乾燥状態で容易に芽胞菌となり、一度土壌が炭疽菌で汚染されると、芽胞菌として感染力を保持しながら数十年生残り、炭疽常在地となる。

ヒトの疾病は、創傷感染による皮膚炭疽、汚染動物肉の経口摂取による腸炭疽、および芽胞を吸引する肺炭疽があるが、肺炭疽が最も死亡率が高く、適切な治療を行わないと99%死亡する。実際、感染後24時間以内に大量の抗生物質を投与すれば死亡率は極端に低下するが、発症してしまうと急激に重篤な状態に陥ってしまう。すなわち、血流中に炭疽菌が入り込んでしまうと抗生物質もほとんど効力がなくなる。昨年度アメリカで起きた炭疽菌によるテロでは、実際に炭疽菌の微粒化し、乾燥させた芽胞菌体が用いられ、貴重な生命を奪った。乾燥粉末は『白い粉』として公開

され、それ以後国内外を問わず悪戯や過剰な反応などで地方衛生研究所は、その検査で多忙となったことは記憶に新しい。検査の間、建物の立ち入り禁止や業務の停止など一般生活に多大に支障を与え、迅速な検査法の必要性が強く望まれていた。しかし、検査体制は世界的にも全く整備されてはならず、国内でも厚生労働省による研修会等で方法を指導してはきたが、国内で提供可能な迅速検査法の確立が急務であった。現在『白い粉』騒動は沈静化してはいるが、またいつ勃発するか予測できない現状で、国内で供給可能な炭疽菌の迅速検出法の確立は重要であると言える。そこで、本研究では、我々の保有している技術や知識を駆使して、キットの作製を試み、実際に市場化にまでこぎつけた。そこで、実際に使用可能なものか、試料の調整方法や反応性について検討し、このキットの有効性を検討・評価した。本研究では、環境中からの迅速検出法は考慮に入れておらず、あくまでも粉状の物質そして菌体、および培養後の検体について迅速性を考慮している。

## B. 研究方法

1. 迅速検出法は炭疽菌の遺伝子検出および菌体抗原の検出の2通りからなり、具体的には以下のようにしてキットを作製した。

### ①PCR法による迅速キットの作製

我々は炭疽菌の迅速検出法にPCR法を用いて、検討・確立してきた。炭疽菌の染色体は約30%のGC含量であるため、安定なプライマーの設定は困難であるが、高温で安定なプライマーセットを選び、土壌、大気、肉からの検査法を確立してきた。これらの技術を用いて更なる迅速検出法の確立を試みた。プライマーの配列は表1に記した2種類を選定した。このプライマーセットは混合プライマーとしても使用可能であることは実証されているが、荚膜遺伝子および毒素遺伝子検出用に別個に作り、更にそれぞれに疑似反応を抑制するためにインターナルコントロールを設定し、作製した。条件は表2に示す。使用機器は迅速性を考慮して宝酒造株式会社より販売されているSmart Cyclerを使用し、キット化は宝酒造株式会社に依頼した。

### ②免疫学的検出法の作製

我々は炭疽の発症機構の解明のために、炭疽菌体に対する抗体を数種類作製した。免疫原としては粗精製荚膜物質、芽胞体および栄養形を用いた。菌体の場合はホルマリン処理後、生菌が存在しないことを確認後、アジュバントと混合後ウサギに注射して作製した。さらに、これらの抗血清からIgG分画を精製後ラテックスビーズに定法に従い結合させて、ラテックスビーズによる迅速検出キットの作出を試みた。キットはデンカ生研株式会社により作製された。

2. 各種検査用サンプルの作製法

#### ①使用菌株

使用炭疽菌株は表3に示した。その他、炭疽菌と分類上近縁である *Bacillus cereus*、*B. thuringiensis*、*B. mycooides*等も加え検討した(表2)。菌株は全て trypticase soy agar および trypticase soy broth (Becton

Dickinson Co., MA. USA) を用いた。

#### ②芽胞菌体の作製法(粉末の作製)

炭疽菌34-F2株から定法に従い芽胞体を作製し、P3実験室内の安全キャビネット内で乾燥させて白色の粉末を作製した。

3. 各種検査用サンプルのPCR用の調整方法

集落の場合は、滅菌蒸留水中に僅か濁る程度の菌体を懸濁し、95℃で15分間加熱後、遠心し、その上静1μlを直接PCRに用いた。粉末状の検体の場合は、滅菌蒸留水で洗浄後、滅菌蒸留水に再懸濁し95℃で15分間加熱後、遠心し、その上静1μlを直接PCRに用いた。粉末の正常によってはPCRを阻害することがあるが、通常テロに用いるものは純粋な芽胞体のみ考えられるので、特に処理は行わない。

4. 一般検査法

検体は染色および培養法を用いた。染色はグラム染色を行い、染色性、形状、芽胞形成を観察した。培養は、粉末状の検体は滅菌蒸留水で洗浄後、一部を直接 *Bacillus cereu* sselection培地(Merck、BBL)、ポリミキシンB添加血液寒天に塗抹し、炭疽菌を確認した。確認後、集落をPCRに直接用いるが、*Bacillus cereu* sselection培地より釣菌した。

5. 免疫学的な検査法のためのサンプル処理と検査方法

培養後の菌体はごく僅かの菌体量をラテックス試薬に懸濁し、凝集を目で観察する。粉末状の検体は滅菌蒸留水で洗浄後、滅菌蒸留水に再懸濁し、その一部をラテックス試薬と混合し凝集を観察する。

6. PCR反応

Smart Cyclerのマニュアルの従い、反応を行った。検出色素はSYBR Greenを用い、リアルタイムで増幅を観察した。反応条件は95℃30秒の後、95℃5秒、68℃30秒を30サイクル繰り返した。その後、マニュアルに従い、増幅産物の融解曲線を調べ、表1に示した融解温度を示す場合を陽性と判定した。陰性の場合、インターナルコントロールによる産物が確認でき、その融解温度は、PAプライマーセットの場合は82.5±1℃、CAPプライマーセットの場合は85±1℃となる。また、確認のため、電気泳動にて産物を確認し

た。増幅産物の大きさは、表1に示したが、インターナルコントロールによる産物の場合はPAプライマーセットの場合は $80 \pm 1^\circ\text{C}$ 、CAPプライマーセットの場合は $82 \pm 1^\circ\text{C}$ となる。

## C. 研究結果

### ①PCRの結果

白い粉、菌株とも毒素産生性、莢膜形成能と一致して陽性となった（表2）。増幅曲線は図1のようになり、さらにその融解温度は、代表例で見るとPAプライマーセットの場合陽性は $82.25^\circ\text{C}$ 、陰性は $80.25^\circ\text{C}$ になり、CAPプライマーセットの場合は陽性は $85.03^\circ\text{C}$ 、陰性は $81.83^\circ\text{C}$ となった（図2）。また、反応産物の電気泳動写真は、図3のようになった。また、このプログラムでの反応時間は約30分で結果が判った。

### ②免疫学的検出

炭疽菌を用いた場合、3種類の抗体で全て凝集塊が観察されたが、他の菌種では観察されなかった（表2）。

## D. 考察

今回試作したキットは炭疽菌を迅速に検査するのに使用可能であり、しかも簡便に判るものとして期待出来る。検査マニュアルを作成する際の標準的な方法として有効であろう。従来の細菌検査法と併用することで、さらに信頼度が増すものと考えられる。

## E. 結論

- ① 検体処理を含め1時間以内にPCRにより炭疽菌を検出可能となったキットを試作した。
- ② 同時に、我国で炭疽菌の免疫学的な検出法は無かったが、ラテックスビーズを利用した方法により瞬時に陽性検体の検出が可能になった。
- ③ 従来の検査法（培養および染色法）も平行して行う必要がある。

## F. 健康危険情報

特に無いが、芽胞から成る白い粉末は他の粉末と差は無く、容易に空中に飛び散るため、処理には安全キャビネットが必須である。しかし、一度懸濁液を作製すれば、乾燥さえしなければ飛散は起こらないので、早急に懸濁液を作るべきである。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. H.I. Cheun, S-I. Makino, M. Watarai, T. Shirahata, I. Uchida, and K. Takeshi. 2001. A simple and sensitive detection system of *Bacillus anthracis* in meat and tissue. J Appl Microbiol. 91: 421-426.
2. S-I. Makino, H.I. Cheun, M. Watarai, I. Uchida, and K. Takeshi. 2001. Detection of anthrax spores from the air using real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. 33: 237-240.

## H. 知的所有権の取得状況

免疫学的診断法のキットをデンカ生研により特許出願する予定。



表 1 使用プライマーとその性質

プライマー 一セット	名称	塩基配列	標的遺伝子	大きさ	融解温度
PA	PA7	ATCACCAGAGGCAAGACACCC	毒素遺伝子	210 bp	82.5 ± 1°C
	PA6	ACCAATATCAAAGAACGACGC			
CAP	MO11	GACGGATTATGGTGCTAAG	莢膜遺伝子	572 bp	85 ± 1°C
	MO12	GCACTGGCAACTGGTTTTG			

表 2 使用炭疽菌と他の菌種の結果

Strains	病原因子		PCR 反応		免疫キット
	PA	CAP	PA	CAP	
<i>B. cereus</i> HSCC187	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> HSCC1049	-	-	-	-	NT
<i>B. cereus</i> HSCC1207	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> HSCC345	-	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i> HSCC395	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomycodes</i> HSCC1477	-	-	-	-	NT
<i>B. weihenstephanensis</i> HSCC1480	-	-	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> IAM1521	-	-	-	-	-
<i>B.adius</i> IAM11059	-	-	-	-	NT
<i>B. cereus</i> IAM12605	-	-	-	-	NT
<i>B. circulans</i> IAM12462	-	-	-	-	-
<i>B. firmus</i> IAM12464	-	-	-	-	NT
<i>B. licheniformis</i> IAM13417	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> IAM13418	-	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i> IAM1190	-	-	-	-	NT
<i>B. pumilus</i> IAM12469	-	-	-	-	NT
<i>B. sphaericus</i> IAM13420	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> IAM 12118	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> IAM12077	-	-	-	-	NT
<i>B. subtilis</i> UOTO 277	-	-	-	-	NT
<i>B. subtilis</i> ISW1214	-	-	-	-	NT
<i>B. megaterium</i> #210	-	-	-	-	NT
<i>B. cereus</i> #211	-	-	-	-	NT
<i>B. thuringensis</i> #12	-	-	-	-	NT
<i>B. natto</i> #213	-	-	-	-	NT
<i>B. subtilis</i> #360	-	-	-	-	NT
<i>B. brevis</i> HPD31	-	-	-	-	NT
<i>B. anthracis</i> Pasteur II	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> Shikan	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> Morioka	-	+	-	+	+
<i>B. anthracis</i> Pasteur I	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> Nakagawa	-	+	-	+	+
<i>B. anthracis</i> Ryugasaki	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 52	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> P-I	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 34-F2	+	-	+	-	+

図1 プライマーセットによる増殖曲線

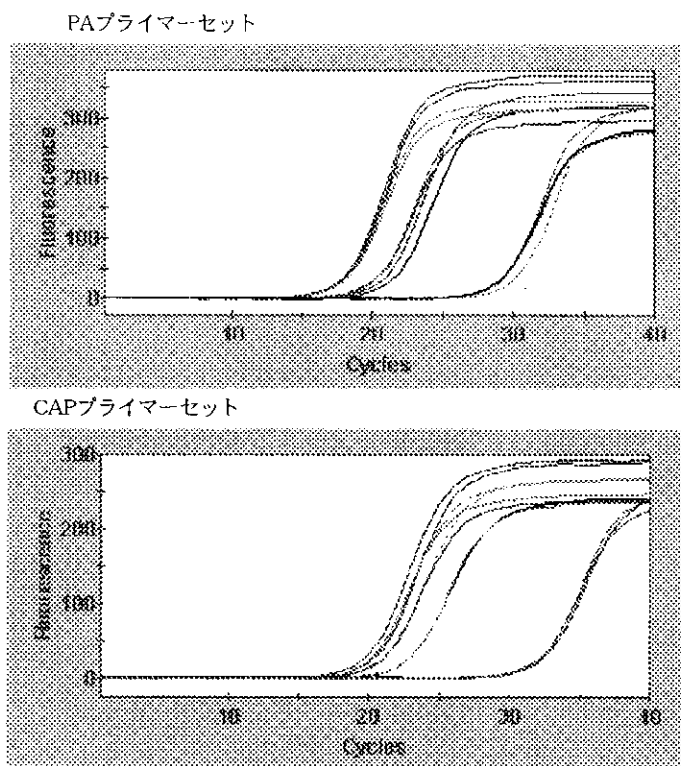


図2 融解曲線

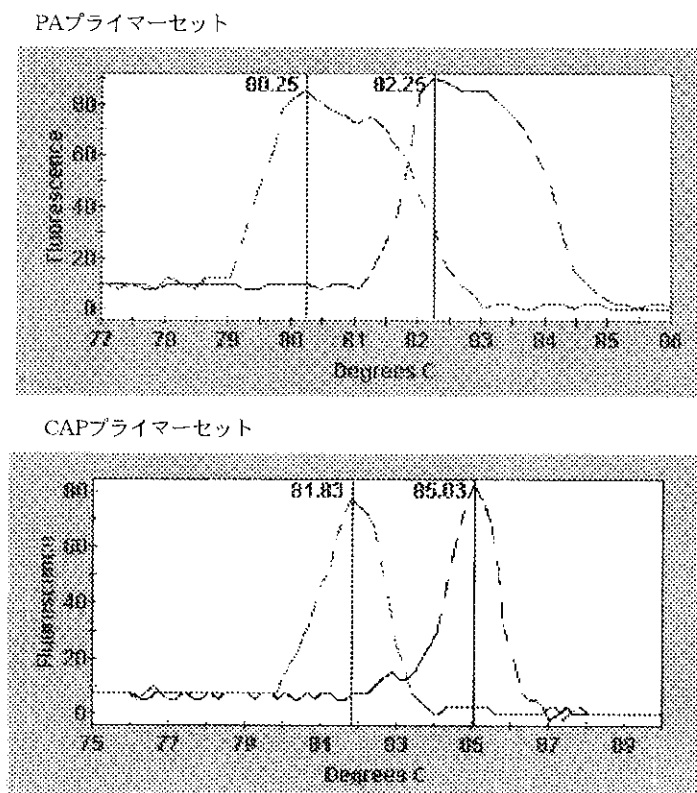
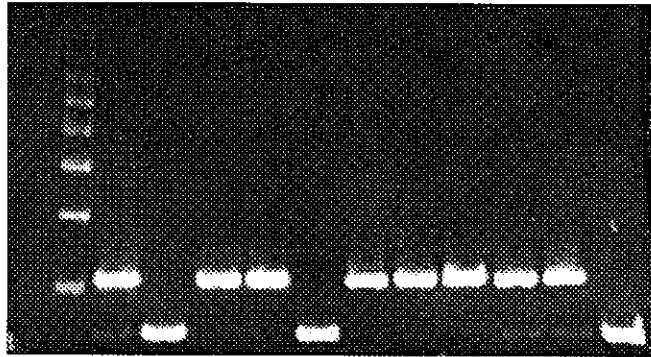


図3 PCRの結果

PAプライマーセット



CAPプライマーセット



左から順番に 100bp ラダーマーカー (図では 200bp から見える)、*B. anthracis* Pasteur II、*B. anthracis* Morioka、*B. anthracis* Shikan、*B. anthracis* Pasteur I、*B. anthracis* Nakagawa、*B. anthracis* Ryugasaki、*B. anthracis* 52、*B. anthracis* P-I、*B. anthracis* 34-F2、白い粉、陰性コントロール。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表