

20020100

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速診断法及び消毒法に関する研究

平成14年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 山田章雄

平成15(2003)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速診断法及び消毒法に関する研究--1
山田章雄

II. 分担研究報告書

1. 野兔病の迅速診断法に関する研究-----5
山田章雄、藤田 修、巽 正志、棚林 清
2. Multiplex-PCR によるバイオテロ関連細菌類の同時検出に関する研究-----12
今岡浩二
3. Rolling circle amplification 法を用いた微量炭疽菌遺伝子の特異的高感度検出法の開発（2）-----16
今岡浩二
4. Pyrosequencing 法を用いた炭疽菌株鑑別法の開発-----19
井上 智、野口 章
5. 炭疽菌の各種抗菌薬に対する薬剤感受性試験-----31
渡辺治雄、廣瀬健二
6. 炭疽菌以外の病原体にユニバーサルに使用できる検出法の開発-----34
井ノ上逸郎
7. 各種消毒剤による炭疽菌芽胞の迅速的不活化に関する研究-----48
高木弘隆
8. 資料 ペスト菌の診断マニュアル（案）-----59

厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)

総括研究報告書

バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速診断法及び消毒法に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所獣医科学部長

研究要旨 バイオテロに使用される可能性が高いとされる炭疽菌、野兎病菌、ペスト菌などについて迅速検出法を検討した。野兎病については real-time PCR 法を確立し、炭疽菌については Pyrosequencing 法を用いた迅速な株鑑別法を確立した。一方、炭疽菌、ペスト菌、野兎病菌、ブルセラ属菌を同時に検出できるマルチプレックス PCR を確立した。更にユニバーサルに使用できる病原体検出法として、DOP-PCR と Pyrosequencing 法を併用した方法を確立した。また、炭疽菌のシプロフロキサシン以外のニューキノロン系抗菌薬に対する薬剤感受性を検討した結果 MIC の高い薬剤が存在することが明らかになった。炭疽菌芽胞の消毒法に関しては、二酸化塩素並びに過酢酸が有効であることが明らかになった。

分担研究者

井ノ上逸郎 東京大学医科学研究所助教授
渡邊治雄 国立感染症研究所細菌第 1 部長
高木弘隆 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室研究員

協力研究者

廣瀬健二 国立感染症研究所細菌第 1 部主任研究官
井上 智 国立感染症研究所獣医科学部室長
棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部室長
巽 正志 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官
今岡浩二 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官
藤田 修 国立感染症研究所獣医科学部研究員

A. 研究目的

炭疽菌、野兎病菌、ペスト菌は天然痘ウイルス、出血熱ウイルス、ボツリヌス毒素と並んでバイオテロに使用される可能性の最も危険度の高いカテゴリーA とされている。炭疽菌に関しては昨年度の科学振興調整費「炭疽菌等生物テロに使用される可能性のある病原体の検出法および滅菌法並びに疾病の治療法の実用化に関する緊急調査研究」でリアルタイム PCR の有用性が示されたが、他の細菌についても迅速検出法を確立しておくことは喫緊の課題である。また、リアルタイム PCR は極めて優れた方法といえるが、高価な機器を必要とすることなどから、普及が困難である可能性がある。そこで本研究では汎用性のある病原体検出法の確立も目指す。また、昨年度非病原性菌をモデルに方法論を確立したパイロシー

ケンシング法についても本研究で継続的に炭疽菌等の病原性菌で実用化をはかる。一方、炭疽菌は芽胞形成すると除染がきわめて困難だとされている。本研究では芽胞に対する有効な消毒法を予め検討しておくことも目的とした。

B. 研究方法

野兎病の real-timePCR は野兎病菌に共通な FopA 遺伝子を検出できるようプライマー及びプローブを設計し、LichtCycler を使用した。マルチプレックス PCR には炭疽、ブルセラ、ペスト、野兎病の各菌を検出できるようプライマー設計を行った。薬剤感受性試験は MIC 法によった。消毒薬については精製炭疽菌芽胞を用い二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸について検討した。DOP-PCR は degenerate oligonucleotide をプライマーとした。

C. 研究結果

1. 高感度の迅速遺伝子検出法として Real-time PCR 法を用いて野兎病菌の共通遺伝子 (FopA) の検出を行った。その結果、FopA 遺伝子 10 コピーが検出可能で、反応開始後 1 時間以内の結果が判定でき、さらに今回検査した日本国内分離 5 株および Russian Vaccine 株でも抗原遺伝子を検出できたことより、野兎病の迅速診断法としては有用性が高いと判断された。
2. 炭疽菌、ペスト菌、野兎病菌、ブルセラ属菌について、1 反応チューブで同時に検出するためのプライマーの組み合わせおよび反応条件を

検討した。炭疽菌では BA813、ペスト菌および仮性結核菌では inv と caf1、野兎病菌では TUL4、ブルセラ属菌では BCSP31 をプライマーミックスとして用い、シャトル法にて反応させることで、比較的短時間で非特異的反応もなく各々の菌が特異的に検出できることが示された。

3. Rolling circle amplification

(RCA) 法による微量の炭疽菌検出を試みた。RCA 法によりサンプル DNA の増幅を行い、その後、炭疽菌特異的遺伝子を増幅・検出する方法を検討した。RCA の時に酵素付属のランダムヘキサマープライマーや PA および CAP 特異的プライマーを用いて、時間を増加させても、その後の PCR による検出では感度が増すことはなかった。このキットはすでにランダムヘキサマープライマーが酵素に混入しているため、目的の (B. A. 特異的) 遺伝子のみ増幅させるのは困難であるように思われた。酵素のみ入手する方法を検討している。

4. 炭疽菌では多型性に富んだ遺伝子マーカーが非常に少ないため遺伝子型別が困難とされているが、近年ゲノム遺伝子に変異の少ない病原性細菌の遺伝子型別を可能とするマーカーとしてゲノム遺伝子の VNTR 多型性が報告されている。本研究では vrrA 遺伝子内の VNTR 領域と病原性プラスミド pX01 と pX02 にあり株間の多型性に富む 2

種類の VNTR 領域を Pyrosequencing 法により塩基配列決定し多型性解析を行った。その結果この方法により迅速に株鑑別が可能であることが明らかになった。

5. DOP-PCR で増幅した全ゲノムから特定の病原体に特異的プライマーを用いた PCR で更に増幅した産物を Pyrosequencing 法で塩基配列決定した。この配列をプラストサーチにかけたところ予想される病原体であることを示す結果が得られた。
6. 炭疽菌のシプロフロキサシン以外のニューキノロン系抗菌薬に対する薬剤感受性を検討した結果ノルフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシンでは MIC が 0.5~2 μ g/ml と高い値を示す株が存在することが明らかになった。これらの株に感染した場合にニューキノロン剤が有効であるか検討する必要がある。
7. 精製炭疽菌芽胞に対する過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素の消毒効果を比較検討したところ、過酢酸は 0.05%~0.1%で 10 分、次亜塩素酸ナトリウムは 1,000ppm で 20 分、活性化二酸化塩素は 500ppm、10 分作用させることにより、芽胞を不活化できることが明らかになった。

D. 考察

real-time PCR よりも汎用性の高い核酸増幅法の検討を行ったが、これまでのところ

余り良好な成績は得られていない。しかし、real-time PCR あるいはマルチプレックス PCR および DOP-PCR などを炭疽、野兔病、ペストなど重要な細菌感染に対して準備できたことは今後のバイオテロ対策に一定の貢献をするものと考えられる。一方、炭疽菌の株の鑑別が迅速に行えるシステムを確立できたことは万が一バイオテロが発生した際の犯罪捜査上重要な手段を提供するものと考えられる。更に、比較的毒性の低い、二酸化塩素が炭疽菌芽胞の消毒に極めて有効であることが示されたことから、除染の際の第一選択肢を提供するものと考えられる。ニューキノロン系の抗菌剤にはある種の炭疽菌には向こうである可能性のあるものの存在が示唆されたことは治療方針決定の際に重要な知見となると思われる。

E. 結論

バイオテロに使用される可能性が高いとされる炭疽菌、野兔病菌、ペスト菌などについて迅速検出法並びに炭疽菌については Pyrosequencing 法を用いた迅速な株鑑別法を確立した。また、ユニバーサルに使用できる病原体検出法として、DOP-PCR と Pyrosequencing 法を併用した方法を確立した。炭疽菌の薬剤感受性を検討した結果、MIC の高いニューキノロン系薬剤が存在することを明らかにした。二酸化塩素並びに過酢酸が炭疽菌芽胞の消毒法に関して有効であることを明らかにした。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 発表論文

Fujita, O., Inoue, S., Tatsumi, M., Kamiyama, T., Akaishi, S., Ootani, T., Kawai, T., Hirochi, T., Sakamoto, Y., Tamura, K., Watanabe, H., and Yamada, A.: Amplification of irrelevant sequence from *Bacillus subtilis* using a primer set designed for detection of the pag gene of *Bacillus anthracis*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 99-100, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速診断法及び消毒法に関する研究

野兎病の迅速診断法の開発に関する研究

分担研究者 山田章雄 国立感染症研究所 獣医科学部長

要旨 ユーゴン血液寒天培地を用いた野兎病菌の分離培養による病原菌の検出法では少なくとも2日以上かかる為、近年様々な抗原遺伝子検出法が検討されている。今回、高感度の迅速遺伝子検出法として Real-time PCR 法を用いて野兎病菌の共通遺伝子(*FopA*)の検出を行った。その結果、*FopA* 遺伝子 10 コピーが検出可能で、反応開始後 1 時間以内の結果が判定でき、さらに今回検査した日本国内分離 5 株および Russian Vaccine 株でも抗原遺伝子を検出できたことより、野兎病の迅速診断法としては有用性が高いと判断された。

A. 研究目的

野兎病は野兎病菌(*Francisella tularensis*)による動物由来感染症であり、北アメリカからヨーロッパにいたる北緯 30 度以北の北半球に分布している。現在 *Francisella tularensis* は 4 亜種に分類されており、これら亜種の毒力の強弱の差はあるもののいずれもヒトに対して病原性を示す。特に北アメリカに分布する *F. tularensis* subsp. *tularensis* は強病原性菌で、家ウサギに対して 1～数個の皮下接種で致死的な病原性を引き起こす。野兎病は早期に診断し適切な抗生物質治療を行えば完治が期待できるが、不適切な診断治療では難治性瘻孔形成、リウマチ様関節痛および発熱等の症状が蔓延化することがある。種々な動物種が愛玩動物

として無秩序に輸入されている現状で、強毒株に汚染された動物が我が国に侵入する可能性が危惧されているとともに、米国においてバイオテロに使用される可能性の高い病原体として野兎病菌も含まれている。本研究においては野兎病菌の抗原遺伝子の迅速高感度検出法の確立を目的に、real-time PCR 法の有用性を検証した

B. 研究方法

菌株—国立感染症研究所獣医科学部に保存されている *F. tularensis* Live Vaccine Strain(LVS)をユーゴン血液寒天培地で培養し、フェノール/クロロフォルムを用いてゲノム DNA を抽出し、鋳型 DNA とした。さらに、(財)大原総合病院附属大原研究所・

藤田博己博士より分与された国内分離株 *F. tularensis* 5 株(Ebina, GIEM, Naomatsu, Yama, Yato96)と Russian Vaccine(RV)株 (藤田、1994 参照) も前述と同様に培養しおよび 鑄型 DNA の抽出を行った。

Real-time PCR 法—Real-time PCR は Roche Diagnostic 社の LightCycler クイックシステム 330 を使用し、プライマーは Forward primer (5'-GGCAAATCTAGCAG GTCA-3'), Reverse primer (5'-GCTGTAGTCGCACCATTATC-3'), ハイブリダイゼーションプローブは 5'-ATGGCAGAGCGGGTACTAAC ATGATTG-3'-Fluorescein, 5'-LCRRed640-TGCTGGTTTAACAT GGTCTTTGGTGG-3'-phosphorylation を用いた。Roche Diagnostic 社の LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probe(Roche: cat.3 003 248)を用いて PCR を行った。プライマーとハイブリダイゼーションプローブおよび反応試薬、鑄型 DNA(10ng/ml)を加えて 20 μ l 全量とし、Fulop ら(1996)、Higgins ら(2000)が報告した *F. tularensis* 共通遺伝子 (*Fop A* の一部: 249bp) を増幅した。反応温度設定は(95 $^{\circ}$ C 10min 1cycle)、(95 $^{\circ}$ C 10sec、60 $^{\circ}$ C 10sec、72 $^{\circ}$ C 10sec 40cycles)で行っ

た。国内分離株および RV 株での反応も LVS 株と同一条件で反応させた。また本法の検出限界は、LVS 株鑄型 DNA の段階希釈液を用いて検討した。

C. 研究結果

1. Real-time PCR 法による野兎病菌の検出限界

F. tularensis LVS 株から抽出した鑄型 DNA を 10 倍段階希釈し、ライトサイクラーを実施したところ 10 コピー以上で 34 サイクル、反応開始 40 分後より検出可能であることが分かった(図 1)。この結果は融点(melting point)の単一ピークとして確認された(図 2)。

2. Real-time PCR 法の有用性

大原研究所より供与された国内分離 5 株および RV 株の抽出 DNA について LVS 株と同一反応条件で実施した結果、調べた全ての株から目的とする遺伝子の増幅が 16 サイクル目以降、反応開始 25 分後から確認され(図 3)、また融点(melting point)でも単一ピークが確認された(図 4)。

D. 考察および結論

バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速診断法の開発という目的で、野兎病菌の抗原遺伝子検出する為に Real-time PCR 法を用いて行った。本法を用いた炭疽菌の迅速診

断キット(LightCycler-Bacillus anthracis Detection Kit (Roche: Cat.3 303 411)はすでに市販され、抗原遺伝子(*pagA*, *capB*)の検出に高い評価を受けている(Bellら、2002)。今回初めて野兎病菌の抗原遺伝子の検出法としてこの手技を応用したところ、設定したプライマーとハイブリダイゼーションプローブの条件により、10コピーから検出可能で、しかもリアルタイムに蛍光の検出が観察できたことは、迅速診断法としては有用性が高いと評価できる。しかし、装置、試薬類が高額であることから特定の機関でしか実施できない難点もある。今後さらに多くの国内外分離株についてこの方法で検討し、本法の信頼性を検証すると共に、より簡便かつ安価でどこでも実施可能な他の手法を開発も必要と考える。

E. 参考文献

Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, Elkins KL, Sjostedt A, Shipley M, Ibrahim MS, 2000. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Top Med Hyg* 62: 310-318
Fulop M, Leslie D, Titball R, 1996. A rapid, highly, sensitive method

for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction.

Am J Top Med Hyg 54: 364-366

藤田博己 (1994) 日本の野兎病研究初期における分離株の消息調査および大原研究所蒐集の野兎病菌とその関連種の保存株リスト 大原年報 37: 5-12

Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, Cockerill FR 3rd. 2002. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2897-902.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

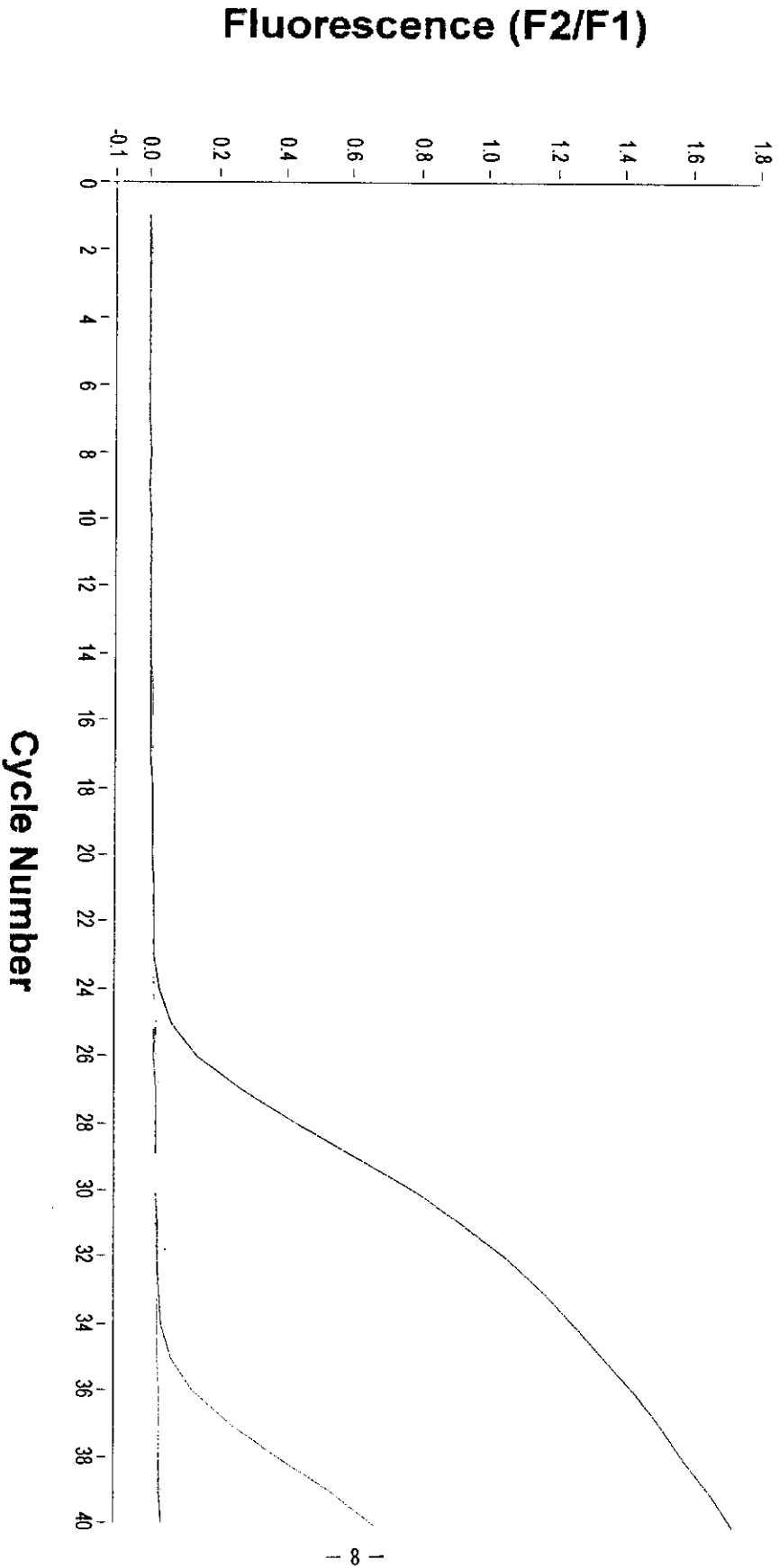
協力研究者 国立感染症研究所 獣医科学部 第三室 藤田 修、巽 正志、棚林 清

LightCycler Baseline Adjustment Report

User: Administrator LightCycler ID#: 3851
Run Version: 5.32 Analysis Version: 3.5.28

File: C:\LightCycler3\Users\Administrator\Data\20020717\Ft-scopes Hybrl 3rd.ABT Program: PCR Run By: Administrator
Run Date: 7/17, 2002 12:29 Print Date:

- 1 Ft:6.4
- 2 Ft:6.3
- 3 Ft:6.2
- 4 Ft:6.1
- 5 Ft:6.0
- 6 Ft:6-Negative
- 7 Ft:9.4
- 8 Ft:9.3
- 9 Ft:9.2
- 10 Ft:9.1
- 11 Ft:9.0
- 12 Ft:9-Negative



Baseline Adjustment: Proportional

Color Compensation: Off

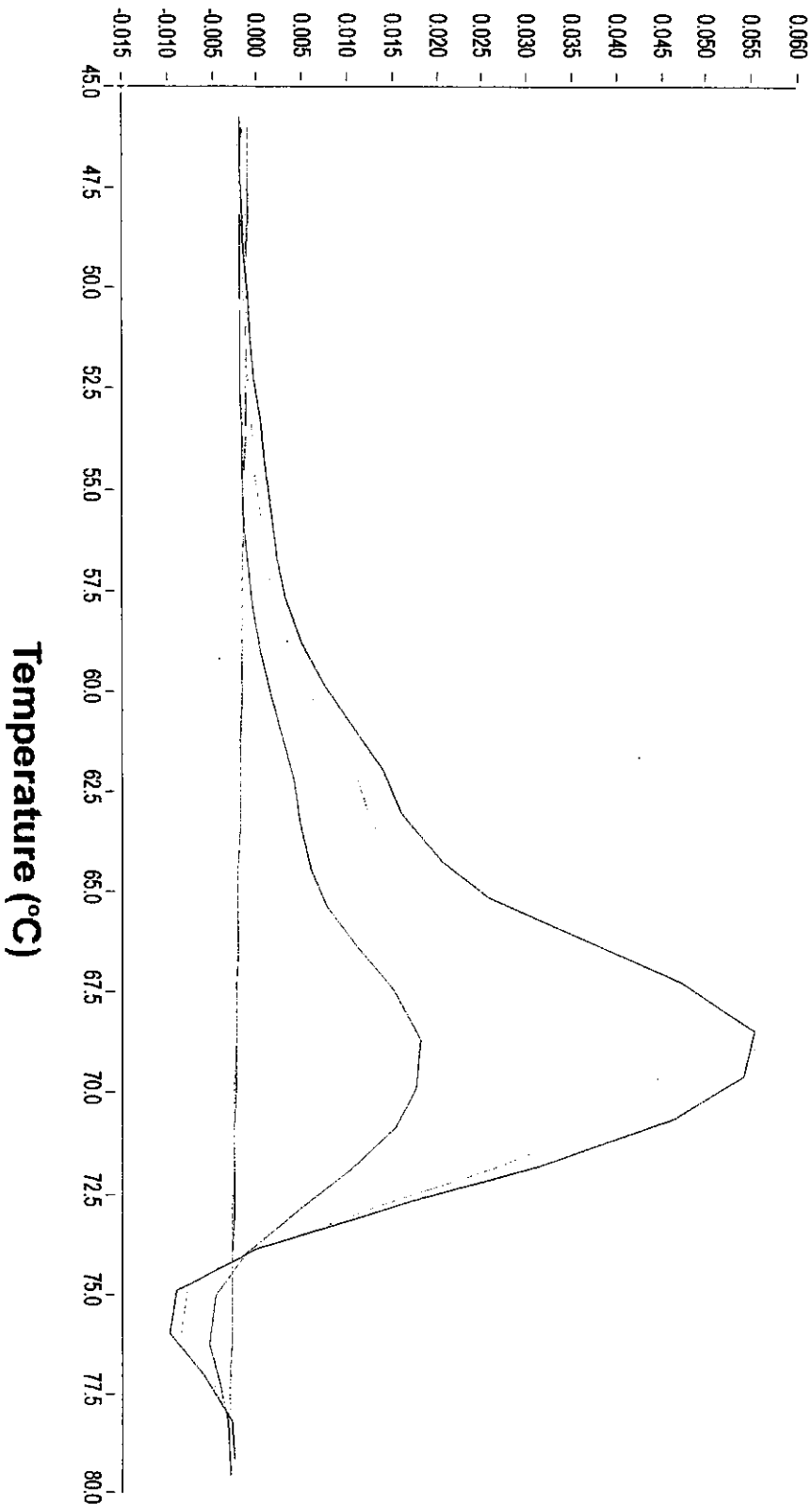
LightCycler Melting Peaks Report

User: Administrator LightCycler ID#: 3861
Run Version: 6.32 Analysis Version: 3.5.28

File: C:\LightCycler\Users\Administrator\Data\20020717\Ft-copies Hybrl 3rd.ABT Program: Melting Curve Run By: Administrator
Run Date: 7/17/2002 12:29 Print Date:

- 1 Ft:6.4
- 2 Ft:6.3
- 3 Ft:6.2
- 4 Ft:6.1
- 5 Ft:6.0
- 6 Ft:6 Negative
- 7 Ft:9.4
- 8 Ft:9.3
- 9 Ft:9.2
- 10 Ft:9.1
- 11 Ft:9.0
- 12 Ft:9 Negative

Fluorescence $-d(F2/F1)/dT$



Digital Filter: Enabled

Calculation Method: Polynomial

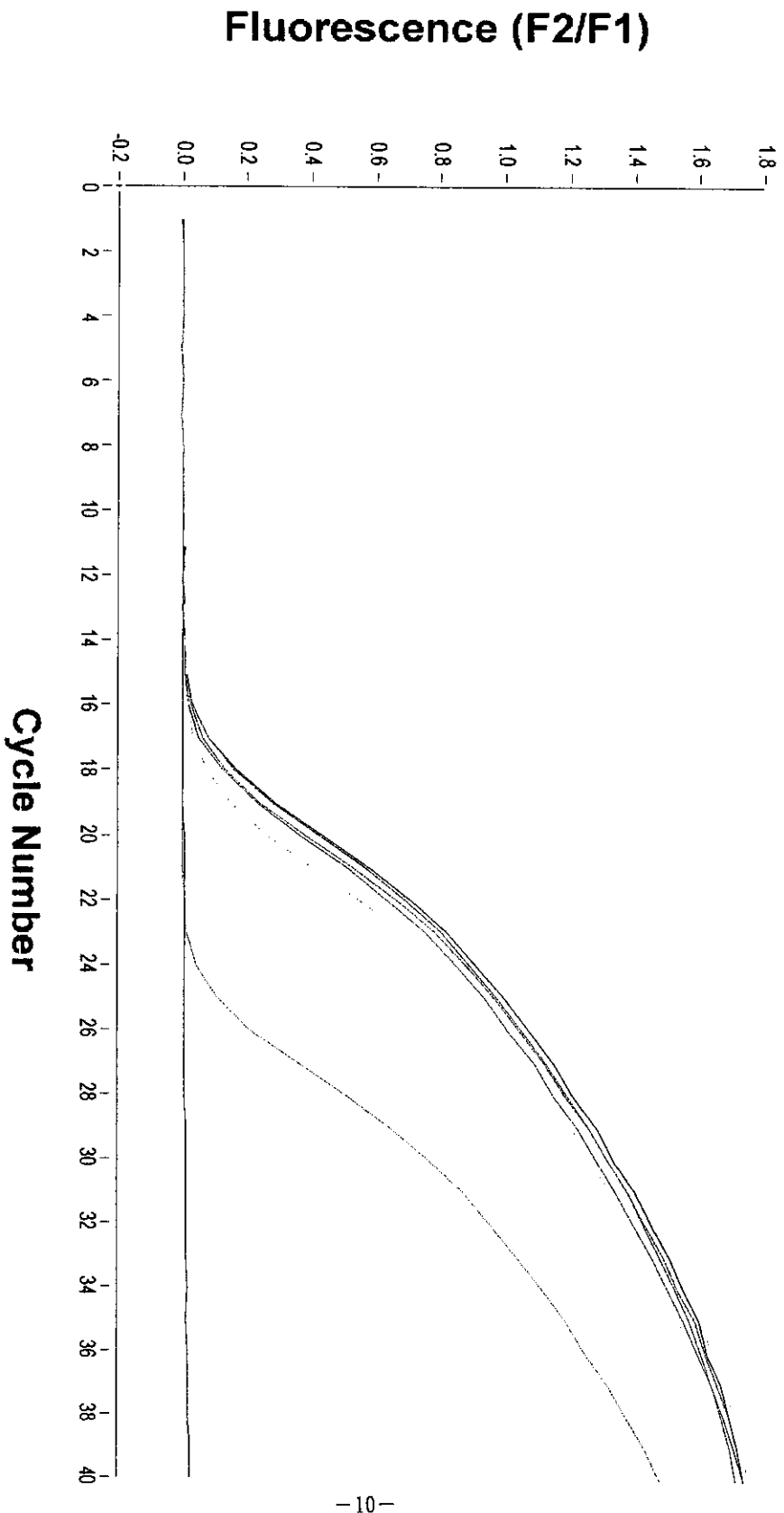
Color Compensation: Off

LightCycler Baseline Adjustment Report

User: Administrator LightCycler ID#: 3851
Run Version: 6.32 Analysis Version: 3.5.28

File: C:\lightcycler3\Users\Administrator\Data\20030306\Ftisolates1st\ABT Program: PCR Run By: Administrator
Run Date: 3/06/2003 17:47 Print Date:

- 1 Negative-TE
- 2 3/3 Ft Ebina-2
- 3 3/3 Ft GIEM-1
- 4 3/3 Ft Naomatsu-1
- 5 3/3 Ft Naomatsu-2
- 6 3/3 Ft Yama-1
- 7 3/3 Ft Yama-2
- 8 3/3 Ft Yato96-1
- 9 3/3 Ft Yato96-2
- 10 3/5 Ft Ebina-2
- 11 3/5 Ft GIEM-1
- 12 3/5 Ft GIEM-2
- 13 3/5 Ft Naomatsu-2
- 14 3/5 Ft Yama-1
- 15 3/5 Ft Yama-2
- 16 3/5 Ft Yato96-1
- 17 3/5 Ft Yato96-2
- 18 FT RV
- 19 FL VS



Baseline Adjustment: Proportional

Color Compensation: Off

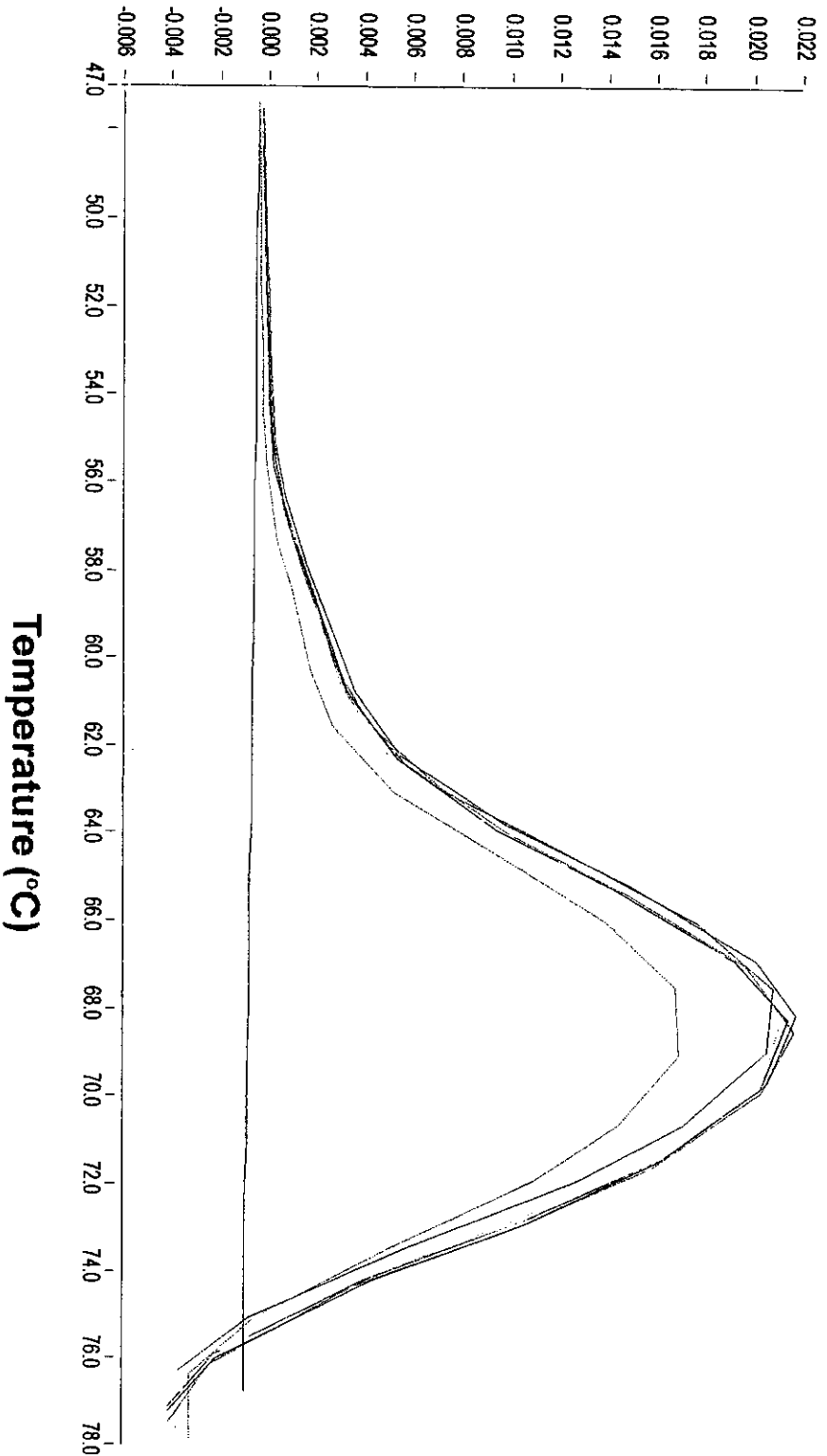
LightCycler Melting Peaks Report

User: Administrator LightCycler ID#: 3861
Run Version: 5.32 Analysis Version: 3.5.28

File: C:\LightCycler3\Users\Administrator\Data\20030306\Fits\olates1.st.ABT Program: Melting Curve Run By: Administrator
Run Date: 3/06/2003 17:47 Print Date:

- 1 Negative-TE
- 2 3/3 Ft Ebina-2
- 3 3/3 Ft GLEM-1
- 4 3/3 Ft Naomatsu-1
- 5 3/3 Ft Naomatsu-2
- 6 3/3 Ft Yama-1
- 7 3/3 Ft Yama-2
- 8 3/3 Ft Yato96-1
- 9 3/3 Ft Yato96-2
- 10 3/5 Ft Ebina-2
- 11 3/5 Ft GLEM-1
- 12 3/5 Ft GLEM-2
- 13 3/5 Ft Naomatsu-2
- 14 3/5 Ft Yama-1
- 15 3/5 Ft Yama-2
- 16 3/5 Ft Yato96-1
- 17 3/5 Ft Yato96-2
- 18 Ft RV
- 19 Ft LVS

Fluorescence $-d(F2/F1)/dT$



Digital Filter: Enabled

Calculation Method: Polynomial

Color Compensation: Off

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）
報告書

Multiplex-PCR によるバイオテロ関連細菌類の同時検出に関する研究

今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨：バイオテロに使用される可能性の高い細菌のなかで、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、ブルセラ属菌について、1反応チューブで同時に検出するためのプライマーの組み合わせおよび反応条件を検討した。炭疽菌では BA813、ペスト菌および仮性結核菌では *inv* と *caf1*、野兔病菌では TUL4、ブルセラ属菌では BCSP31 をプライマーミックスとして用い、シャトル法にて反応させることで、比較的短時間で非特異的反応もなく各々の菌が特異的に検出できることが示された。

A. 研究目的

バイオテロに使用されうる細菌としては、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、ブルセラ属菌が知られている。これらを検出するには、いわゆる細菌学的な培養による方法と、PCR を用いた細菌特異的遺伝子の検出がある。また、何らかの細菌が混入していると考えられる不審物等があった時、常に、はじめからその菌種がわかっている場合だけではなく、その細菌が何であるかを迅速に突き止めることが重要である。そのためには、数種の細菌に対して一度に検査可能なシステムが簡便で、迅速であると思われる。今回、上記4種の細菌について、Multiplex-PCR を行うためのプライマーおよび反応条件の検討を行い、それぞれの菌を検出できるシステムを作成することを目的とした。

B. 研究方法

細菌：炭疽菌 (*B. anthracis*, Pasteur II strain)、ペスト菌 (*Y. pestis*, A1122 strain)、野兔病菌 (*F. tularensis*, Live vaccine strain)、ブルセラ属菌 (*B. abortus* および *B. canis*)、仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis* 2a)、エルシニア菌 (*Y. enterocolitica* O9)、セレウス菌 (*B. cereus*) から DNA を抽出して用いた。
プライマー：炭疽菌に関しては、染色体

遺伝子 BA813 を標的とした BA813-R1/R2 (増幅長：152 bp)、病原性プラスミドのうち感染防御抗原 PA を標的とした PA-8/5 (597 bp)、莢膜遺伝子を標的にした CAP-1234/1301 (847 bp)、ペスト菌に関しては、細胞侵入性のための遺伝子である *inv*-S/AS (295 bp)、ペスト菌特異的な 60Md プラスミドにある Fraction1 抗原の *caf1*-S/AS (171 bp)、7Md プラスミドにあり、病原性に関するプロテアーゼの *pla*-S/AS (480 bp)、また、ペスト菌のクロモゾーム特異的な 41.7 kb 領域における 3a-S/AS (275 bp) を検討した。これらのうち、*inv* は仮性結核菌も検出する。野兔病菌に関しては、17kDa 主要膜タンパクに対する TUL4-435/863 (407 bp) を用いた。ブルセラ属菌は、細胞表面タンパク BCSP31 に特異的な BCSP31-B4/B5 (224 bp)、外膜タンパク OMP-2 に特異的な OMP-JPF/JPR (192 bp)、リボゾーム RNA (16S rRNA) に特異的な 16SrRNA-F4/F2 (904 bp) を用いた。

反応条件：それぞれのプライマーを用いて行う PCR の条件を比較し、アニーリングの温度を種々に変更して PCR を行い、標的とする4菌種（炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、ブルセラ菌）に特異的な遺伝子が検出される条件を検討した。次に各プライマーを数種類ずつ組み合わせ

て PCR を行い、特異的反応は認められるが非特異的反応が起こらない条件を検討し、最適な組み合わせと反応条件を調べた。

C. 研究結果およびD. 考察

炭疽菌の検出に用いられるプライマーのうち、PA-8/5 および CAP-1234/1301 は、そのアニーリング温度がもっとも低く (50°C)、逆に、ペスト菌に用いる 3a-S/AS は高い (65°C)。これらのプライマーとほかのプライマーを組み合わせで 50°C で使用した場合、ほかのプライマーで非特異的なバンドが認められることが多く、特に 3a-S/AS は 60°C でも非特異的反応が認められた。さらに温度を 54°C 以上にすると炭疽菌の PA-8/5 および CAP-1234/1301 では反応しなくなるため両者は組み合わせに用いるには不適であると考えられた。そのため、炭疽菌では、BA813-R1/R2 を用いることにした。また、inv-S/AS はペスト菌だけでなく仮性結核菌も検出するため、ほかのペスト菌特異的なプライマーと組み合わせることにより、ペスト菌と近縁の仮性結核菌の鑑別も可能となる。そこで、BA813-R1/R2 と inv-S/AS、野兔病菌に対する TUL4-435/863 を固定した組み合わせとし、ペスト菌およびブルセラ属菌に対するプライマーから1つずつをこれに組み合わせで検討したところ、Table 1 に示した組み合わせがもっとも適していることがわかった。反応条件も時間と簡便性を考慮しながら種々の条件を検討したところ、シャトル法 (Table 2) が時間も手間も簡単であり、結果もほかのアニーリングとエクステンションを別の温度設定で行う方法と変わりが無いことが示された。

それぞれの反応の特異性を検討したところ、炭疽菌は BA813-R1/R2、ブルセラ属菌 (*B. abortus* および *B. canis*) では BCSP31-B4/B5、野兔病菌では TUL4-435/863 のみで検出された。また、ペスト菌では inv-S/AS および caf1-S/AS で、仮性結核菌では inv-S/AS のみで検出さ

れ、両者の鑑別がなされていた (Fig. 1)。検出感度に関しては、炭疽菌および野兔病菌では 100 pg、ブルセラ属菌およびペスト菌では 10 pg まで、検出可能であった (Fig. 2)。このように、炭疽菌では BA813、ペスト菌および仮性結核菌では inv と caf1、野兔病菌では TUL4、ブルセラ属菌では BCSP31 をプライマーミックスとして使い、シャトル法にて反応させると、比較的短時間で非特異的反応もなく各々の菌が検出可能であり、有用な方法であると考えられた。

E. 結論

BA813、inv、caf1、BCSP31、TUL4 の5種類のプライマーの組み合わせで、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、ブルセラ属菌、仮性結核菌が同時に検出可能であった。検出感度において、炭疽菌がやや低い傾向が認められるので、BA813 よりも適切なプライマーの選定も含め、さらに改良する必要もあると考える。

F. 健康危害情報

バイオテロが起こりうるのが現実問題となってしまう今日、未知のサンプルから、簡便に迅速にその病原体を検出することが必要である。

G. 研究発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1) 用いた Primer のデザイン

Target	Primer name	Sequence	Length Genbank
B. anthracis	BA813-R1	5'-AAC gAT AgC TCC TAC ATT Tgg Ag	152 bp
	BA813-R2	5'-TTA ATT CAC TTg CAA CTg ATg gg	U46157
Y. pestis	inv-S	5'-TAA ggg TAC TAT CgC ggC ggA	295 bp
Y. pseudotuberculosis	inv-AS	5'-CgT gAA ATT AAC CgT CAC ACT	M17448
Y. pestis	caf1-S	5'-CAg gAA CCA CTA gCA CAT C	171 bp
	caf1-AS	5'-CCC CCA CAA ggT TCT CAC	AF528537
Brucella spp. (B. abortus, canis)	BCSP31-B4	5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA	224 bp
	BCSP31-B5	5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg	M20404
F. tularensis	TUL4-435	5'-gCT gTA TCA TCA TTT AAT AAA CTg CTg	407 bp
	TUL4-863	5'-TTg ggA AgC TTg TAT CAT ggC ACT	M32059

Table 2) PCR の反応条件 (Shuttle 法)

95 °C、2 min.
--- ×35 cycle (95 °C、1 min. 60 °C、1 min.)
--- 60 °C、7 min.
--- 4 °C

Fig. 1) Multi-primer (BA813, BCSP31, inv, caf1, TUL4) による特異性

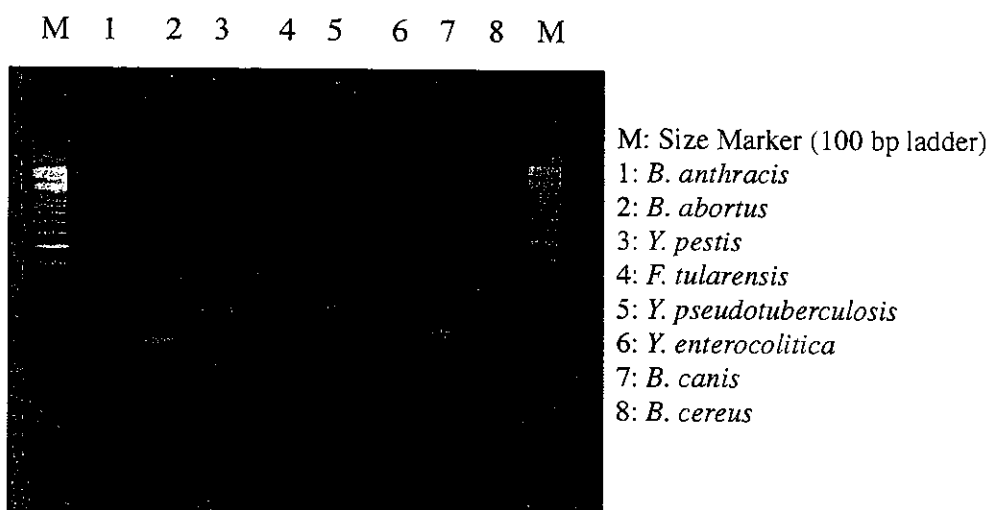
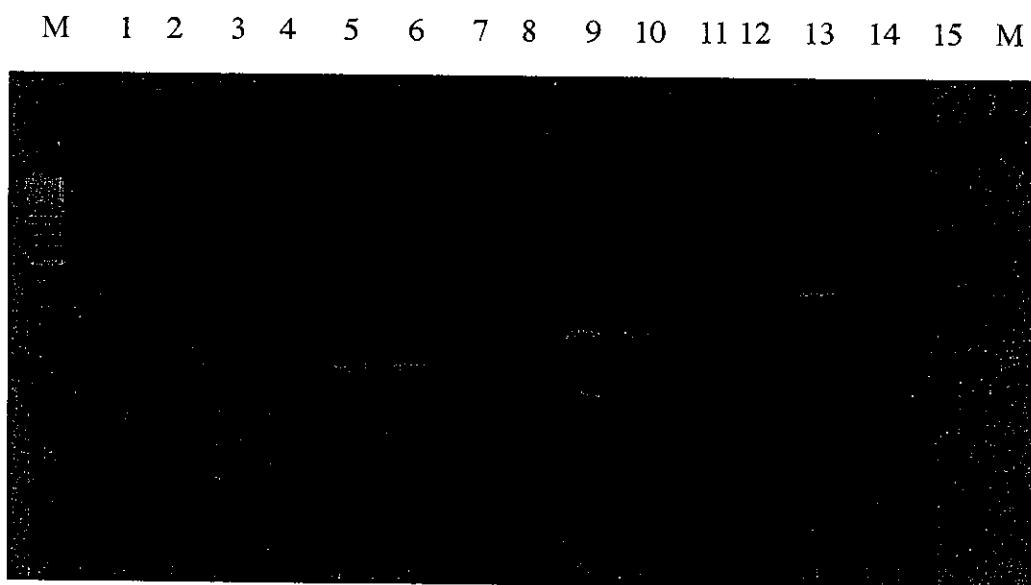


Fig. 2) Multi-primer (BA813, BCSP31, inv, caf1, TUL4) による検出感度



1~4: *B. anthracis* (1ng ~1pg)

5~8: *B. abortus* (1ng ~1pg)

9~12: *Y. pestis* (1ng ~1pg)

13~16: *F. tularensis* (1ng ~1pg)

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）
報告書

Rolling circle amplification 法を用いた
微量炭疽菌遺伝子の特異的高感度検出法の開発（2）

今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨： 微量の炭疽菌（B. A.）遺伝子を検出する方法として、Rolling circle amplification（RCA）法の応用を試みた。RCA 法によりサンプル DNA の増幅を行い、その後、B. A. 特異的遺伝子を増幅・検出する方法を検討した。RCA の時に酵素付属のランダムヘキサマープライマーや PA および CAP 特異的プライマーを用いて、時間を増加させても、その後の PCR による検出では感度が増すことはなかった。このキットはすでにランダムヘキサマープライマーが酵素に混入しているので、目的の（B. A. 特異的）遺伝子のみ増幅させるのは困難であるように思われた。酵素のみ入手する方法を検討している。

A. 研究目的

あるサンプルへ混入している炭疽菌（B. A.）を検出するにおいて、必ずしも、一般的な検出法（菌培養、特異的 PCR 法など）で検出できるほど十分量の B. A. が、混入しているとは限らない。そこで、微量の B. A. であっても検出できる、高感度検出法の開発が必要であると考えられる。近年、プラスミド遺伝子など、環状 DNA を効率よく増幅させる方法として、Rolling circle amplification（RCA）法が報告された。昨年度、「科学技術振興調整費、炭疽菌等生物テロに使用される可能性のある病原体の検出法および滅菌法並びに疾病の治療法の実用化に関する緊急調査研究」で、B. A. 毒素遺伝子のうちプラスミドにある防御抗原遺伝子（PA）と夾膜遺伝子（CAP）の検出について RCA 法を検討した。昨年度は、迅速性を重要視して検討したため、反応時間を極力短く設定したが、今回は迅速性を少々犠牲にしても検出感度を上げるという点に主眼を置き、RCA 反応時間の延長並びに、プライマーとして PA, CAP 特異的なものも使用して実施検討した。

B. 研究方法

市販され、入手可能な RCA キット（TempliPhi 100 Amplification Kit, Amersham 社）を使用した。RCA 法は、まず、環状になった標的 DNA にプライマーが結合し、そこを起点として Bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase による DNA 合成が開始する。本酵素は、直鎖状 DNA よりも環状 DNA を鋳型とした合成を好み、長大な一本鎖 DNA を、増幅産物としてもたらす（Fig. 1）。ただし、本 kit では、ランダムヘキサマープライマーが酵素のチューブにあらかじめセットされてしまっているため、ランダムヘキサマープライマーを除去して、酵素のみの使用ができない。B. A. DNA サンプルを RCA 法により 30 °C で 6 または 12 時間増幅した。その後、一部のサンプルは、ランダムヘキサマープライマーをカラムにより除去した後、PA および CAP に対するプライマーを用いて PCR を行った。さらに、B. anthracis detection kit（Roche Diagnostics 社）を用いて Light Cycler（Roche Diagnostics 社）により、B. A. 毒素遺伝子のうち防御抗原遺伝子（PA; *pagA*）および夾膜遺伝子（CAP;

capB) の特異的増幅・検出も行った。

C. 研究結果およびD. 考察

6 ないし 12 時間 RCA をした後で、PA および CAP 特異的プライマーを使用して PCR を行ったが、RCA をしないものでは 10 pg、RCA をしたものでは 100 pg まで検出され、むしろ RCA をしないものの方が低い濃度まで検出できる結果となってしまう (Fig. 2)。また、RCA 後にカラムを用いて、ランダムヘキサマープライマーを除去しなかったものは、PCR の時にランダムヘキサマープライマーが反応を阻害するためか、増幅すらうまく起こらなかった (Fig. 2)。また、B. anthracis detection kit (Roche Diagnostics 社) を用いて Light Cycler (Roche Diagnostics 社) により、pagA および capB の特異的増幅・検出も行ったが、PCR と同様に、RCA をしない方がうまく検出される結果となった (データは示さず)。RCA の時に PA および CAP 特異的プライマーを添加して RCA を行っても結果は、ランダムヘキサマープライマーのみの時と変わらなかった (データは示さず)。RCA 法で DNA の増幅がうまくいっていない可能性も疑われたが、RCA 後のサンプルを確認したところ、DNA は増幅されていた (データは示さず)。以上のことから、ランダムヘキサマープライマーではなく、B.A. 特異的プライマーを数種類セットにして用いる方が、効率よくプラスミド DNA の目的部分を増幅し、感度を増強できると考えられる。しかしながら、本 kit では、ランダムヘキサマープライマーが酵素のチューブにあらかじめセットされてしまっているため、ランダムヘキサマープライマーを除去して、酵素のみの使用ができない。新しい別の酵素を入手し、応用することを考えるか、Bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase が市販されるのを待つ必要がある。

E. 結論

RCA 法の応用を試みてきたが、現在入手可能な RCA キット (TempliPhi 100 Amplification Kit, Amersham 社) では、ランダムヘキサマープライマーが酵素と同じチューブに混合されていて、酵素単独では市販されていない。そのため、特異的プライマーを用いても、ランダムヘキサマープライマーによる増幅に影響されてしまう。新しい別の酵素を入手し、応用することを考える必要がある。

Fig. 1) RCA の理論

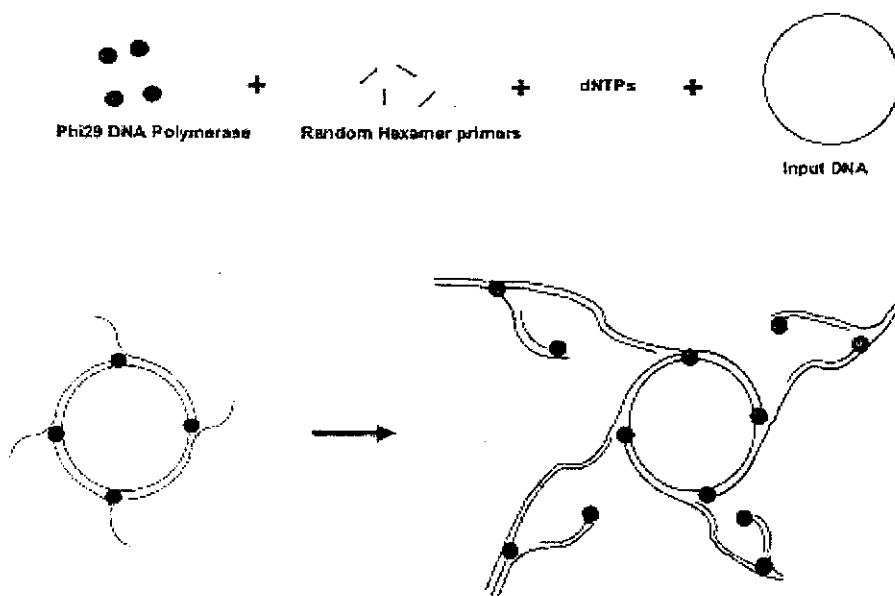
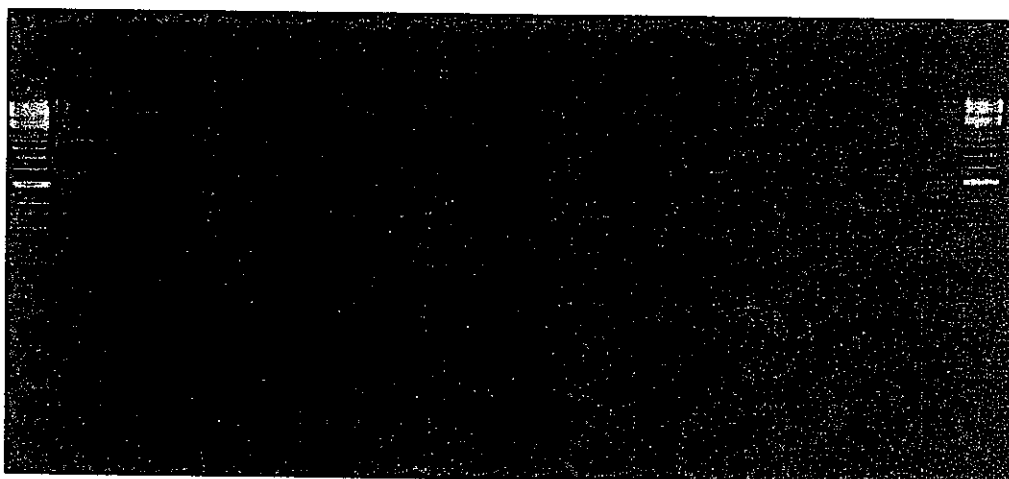


Fig. 2) RCA 12 時間後のサンプルからの PCR による CAP 特異的遺伝子の検出

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



M: Size marker (100 bp ladder)

1-5: RCA を行わないサンプル

6-10: RCA 後のサンプル

11-15 : RCA 後、ランダムヘキサマープライマーを除去したサンプル
それぞれ、100pg DNA から 10 倍希釈