

1. 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

- Pyrosequencing 法を用いた炭疽菌株鑑別法の開発 -

研究協力者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室員

研究要旨：生物テロが疑われる事例の初期対応では、迅速な病原体診断（検出および同定）以外に、同定された菌株の由来判断（テロ目的の株か一般の分離株か）が重要となる。本研究では、生物テロに使用される危険度の高い炭疽菌（*B. anthracis*）に特異な遺伝子の繰り返し配列（VNTR；variable-number tandem repeat）を Pyrosequencing 法で迅速に検出して型別を試みる方法を開発した。

A. 研究目的

生物テロが疑われた場合には、その初期対応で速やかに分離菌株の由来を明らかにして生物テロへの対応判断が正しく行なわれなければならない。本研究では、生物テロに使用される危険度の高い炭疽菌（*B. anthracis*）の遺伝子型別を Pyrosequencing 法の利用により迅速化することを試みた。*B. anthracis* 株間の遺伝子型は、ゲノム上の *vrrA* 遺伝子と病原性プラスミド pX01 と pX02 上に見られる繰り返し（VNTR；variable-number tandem repeat）領域の多型性を利用して行なった。

B. 研究方法

菌株：国立感染症研究所獣医科学部で維持している *B. anthracis* (PAI 株、PAII 株) および国立感染症研究所細菌部 廣瀬博士が所有している *B. anthracis* (CBA99001 株、CBA99004

株、CBA99003 株、CBA99005 株、CBA99006 株、CBA99007 株) を使用した (表 1)。

PCR：プラスミド pX01 上の VNTR 配列 (aat)、pX02 上の VNTR 配列 (at) およびゲノム上 *vrrA* 遺伝子内の VNTR 配列 (caatatcaacaa) の増幅は表 2 に示すセンスプライマーとアンチセンスプライマーで行なった。PCR 反応は、ASTECC 社製の PC808 を使用した (表 3)。

Pyrosequencing：Pyrosequencing は、DNA polymerase が塩基伸長する際に定量的に産生される PPI (ピロリン酸) と APS (アデノシン-5'-ホスホ硫酸) を sulfurylase が基質として産生する ATP と luciferin を基質として luciferase が起こす発光反応を CCD カメラにより検出して塩基の取込みを定量的に検出していく。核酸の伸長反応はコンピュータ制御で塩基配列に従って行なうことが可能である。Pyrosequencing の塩基添加プログラムはプラスミド pX01 上の VNTR 配列 (aat)、pX02 上の VNTR 配列 (at) およびゲノム上 *vrrA* 遺伝子内の VNTR 配列 (caatatcaacaa) を含む領域の塩基

配列から作成した。今回行なった Pyrosequencing における核酸注入順序は、pX01 の aat 領域と pX02 の at 領域では [GCTG-15X[AT]-CACT]、*vrroA* の caatatcaacaa 領域では [GTATG-6X[TGTGATATG]-C] である。Pyrosequencing に使用したシーケンスプライマーは表 2 に記載したものを使用した。Pyrosequencing に使用したサンプル DNA の調整方法は表 4 に略記した。反応条件等は Pyrosequencing AB 社のプロトコールに従った。

プライマーの設計：PCR プライマーは Keim, P. らの報告 (J. Bacteriol. 182:2928-2936.) を参考にして作成した。Pyrosequencing に使用したプライマーはデータベースに登録されている塩基配列を参考に作成した (プラスミド pX01 : ACCESSION No. AF065404、pX02 : ACCESSION No. AF188935、*vrroA* : ACCESSION No. L48553)。

C. 研究結果

PCR 産物の特定

PAI 株のプラスミド pX01 と pX02 および *vrroA* 遺伝子の VNTR 配列を含む領域の PCR 増幅像を図 1 に示した。PCR 増幅に使用したプライマーで pX01、pX02、*vrroA* 各遺伝子に特異的な 132 bp、136bp、303 bp のバンドが増幅された。

Pyrosequencing による VNTR 配列の検出

PAI 株について、pX01、pX02、*vrroA* 各遺伝子の VNTR 領域のピログラム (pyrogram) を図 2 に示した。VNTR 部位を ([]) で図中に示した。プラスミ

ド pX01 の VNTR 配列 [aat] は 7 回、プラスミド pX02 の VNTR 配列 [at] は 1 1 回、*vrroA* 遺伝子の VNTR 配列 [caatatcaacaa] (*vrroA* 遺伝子 VNTR 配列の pyrosequencing はアンチセンスの塩基配列 [ttgttgatattg] を読んでいる) は 4 回の繰り返しであった。同様にして、各菌株について VNTR 配列数を確認した。

由来の異なる菌株の VNTR 数

由来の異なる *B. anthracis* 8 株の VNTR 数を表 6 にまとめた。異なる研究機関で維持されている PAI 株、PAII 株、Davis 株に VNTR 数の多型性が見られた。VNTR 数の変異はプラスミド pX01 上の VNTR (aat) と pX02 上の VNTR (at) で多く、ゲノム上 *vrroA* 遺伝子内の VNTR 配列 (caatatcaacaa) では少なかった。無芽胞毒素非産生莢膜保有菌である Davis 株では、pX01 上の VNTR (aat) 遺伝子の増幅が見られないのは CBA99007 株のみであり、CBA99003 株と CBA99006 株では毒素遺伝子に変異があるが、プラスミドは欠損していないことが明らかとなった。一方、無莢膜弱毒菌である Sterne 34F2 株では、pX02 上の VNTR (at) 遺伝子の増幅が見られず、莢膜遺伝子をコードするプラスミドの欠損が示唆された。

D. 考察

生物テロでは使用された病原体の迅速な分離と使用された病原体株の特定が重要な課題である。本研究の目的は、既存の PCR 法に Pyrosequencing 法を組み合わせて PCR 増幅された *B. anthracis* に特異的な遺伝子産物の塩基配列を短時間でシーケンスすることにより分離された病原微生物の確

定と型別を遺伝子レベルで迅速かつ正確に行うことである。また、Pyrosequencing は核酸の伸長反応を1種類ずつの dNTPs を取り込ませながら行なうため1塩基の反応と発光の検出は1分弱である。今回行なった *B. anthracis* の pyrosequencing は、サンプルの調整時間を加えて3時間以内で終了した。

生物テロが疑われた場合の炭疽菌検査では、被害者に対する適切な臨床対応を行なうために分離菌株の病原性遺伝子の変異を特定することも重要である。今回、2つの病原性プラスミド（プラスミド pX01: *lef* 遺伝子、*pag* 遺伝子、*cya* 遺伝子をコード、プラスミド pX02: *capB* 遺伝子、*capC* 遺伝子、*capA* 遺伝子をコード）で見られる VNTR 領域について検出を行なうことで、病原性プラスミドの有無についても同時に判定することができた。また、Davis 株の VNTR 配列多型性から、同じ菌株でも由来によって病原性プラスミドの欠損や遺伝子の変異がしばしば起きていることが明らかとなった。

B. anthracis 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。Keimらは、ゲノム上の VNTR 領域 (*vrrA*, *vrrC1*, *vrrC2*, *vrrB2*, CG3) とプラスミド上の VNTR 領域 (pX01-*aat* と pX02-*at*) を利用した *B. anthracis* 株間の遺伝子系統樹を報告している (Keim, P., et al. J. Bacteriol. 182:2928-2936, 2000.)。今回、解析が進んでいる VNTR 配列として *B. anthracis* 株間の比較報告の多い *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 領域を利用し

て Pyrosequencing 法による遺伝子型別が可能であることを示した。また、Pyrosequencing 法は遺伝子診断の迅速化、塩基配列決定による PCR 増幅産物の特定と VNTR 領域の多型性を利用した菌株の型別を可能にする点が従来の方法よりも優れていると考えられた。

今後の課題としては、(1) real-time PCR 等の新しい遺伝子増幅法を併用してさらに迅速な遺伝子検出を可能にするるとともに(2)他の VNTR 領域の多型性を併用することにより外来性の *B. anthracis* 株について遺伝子型とその由来を特定可能にすることである。現在、*B. anthracis* と同様に生物テロの病原微生物として上げられている *Francisella tularensis* についても Pyrosequencing 法を利用した遺伝子型特定システムの確立を試みている。

E. 結論

生物テロが疑われる事例の初期対応では、迅速な病原体診断（検出および同定）以外に、同定された菌株の由来判断（テロ目的の株か一般の分離株か）が重要となる。本研究では、生物テロに使用される危険度の高い炭疽菌

(*B. anthracis*) に特異な遺伝子の VNTR 配列を Pyrosequencing 法で迅速に検出して分離菌株の遺伝子型別を試みる方法を開発した。今後の課題としては、

(1) real-time PCR 等の新しい遺伝子増幅法を併用してさらに迅速な遺伝子検出を可能にするるとともに(2)他の VNTR 領域の多型性を併用することにより外来性の *B. anthracis* 株について遺伝子型とその由来を特定可能にすることである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Osamu, F., Inoue, S., Masashi, T.,
Kamiyama, T., Akaishi, S., Otani, 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
designated for detection of the *pag* gene of
Bacillus anthracis. 2002. Jpn. J. Infec. Dis.
55: 99-100.

2. 学会発表等

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

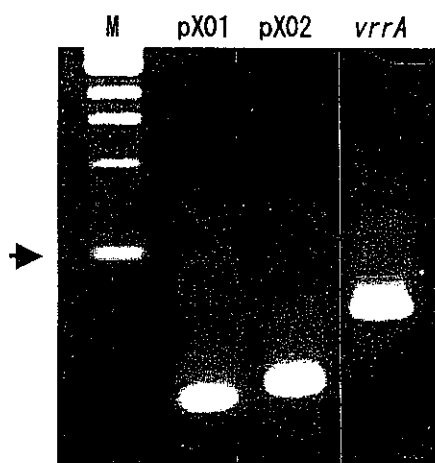
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. くり返し配列 (VNTR) 部位の
PCR増幅像



cf. M = 1 Kb ladder

▶ = 500bp

表 1. パイログラムによりくり返し配列 (VNTR) を確認した炭疽菌株

菌株名	由来	特徴・その他
PAI	獣医科学部	—
PAII	獣医科学部	—
PAII (CBA99001)	千葉県衛生研究所	—
PAII (CBA99004)	千葉県衛生研究所	—
Sterne 34F2	千葉県衛生研究所 動物用ワクチン株	無莢膜弱毒菌
Davis (CBA99003)	千葉県衛生研究所 ファージ液製造用株	無芽胞、毒素非産生、莢膜保有
Davis (CBA99006)	千葉県衛生研究所 ファージ液製造用株	無芽胞、毒素非産生、莢膜保有
Davis (CBA99007)	千葉県衛生研究所 ファージ液製造用株	無芽胞、毒素非産生、莢膜保有

表2.くり返し配列 (VNTR) の確認に使用したプライマー

確認遺伝子	プライマー	ビオチン化	塩基配列
pX01	センスプライマー	-	CAATTTATTAACGATCAGATTAAGTTCA
	アンチセンスプライマー	+	TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGG
	シークエンスプライマー	-	AAAATTTTCAAATGGAT
pX02	センスプライマー	-	TCATCCTCTTTTAAGTCTTGGGT
	アンチセンスプライマー	+	GTGTGATGAACTCCGACGA
	シークエンスプライマー	-	TTTGCGGTATGTGAAA
vrrA	センスプライマー	+	CACAACCTACCACCGATGGCAC
	アンチセンスプライマー	-	CGTTTGATTCATACATTTG
	シークエンスプライマー	-	GCTGTGAGTATTGTTGC

表 3. PCRの反応条件

反応液の組成

TaKaRa Ex Taq (5U/ul)	0.25ul
10x ExTaq Buffer	5.0 ul
dNTP Mixture (2.5mM each)	4.0 ul
DW	37.75 ul
	47.0 ul
sense primer (10 pmol/ul)	1.0 ul
antisense primer (10 pmol/ul)	1.0 ul
Sample cDNA (50-150ng)	1.0 ul
	50.0 ul

反応サイクル

ステップ	サイクル	反応	条件
1	1	熱変性	95C, 5 min
2	40	熱変性	95C, 15 sec
		会合	55C, 30 sec
		伸長反応	72C, 30 sec
3	1	伸長反応	72C, 5 min

表 4. Pyrosequencing反応に使用するサンプルDNAの調整

1	5ul のPCR反応液 (50-150ngのcDNA量に相当) をPyrosequencing に使用。
2	96穴プレートにPCR反応液 (5ul) 、 Sepharose Beads (Streptavidin Sepharose、Amersham、Sweden) (10ul) 、 2X - Binding buffer (15ul) を加える。
3	96穴プレートを15分間シェーキング (25°C、1400rpm) してサンプルをイモビライズさせる。
4	フィルタープレート (MultiScreen、MILLIPORE、USA) にサンプルを移して吸引装置で溶液を除去する。
5	各ウェルに50ulのDenaturation solution (0.2M NaOH) を加えて1分間のcDNA変性を行う。
6	150ulのWashing buffer (10mM Tris-HCl、pH7.6) を加えて吸引装置で2回洗う。
7	50ul のAnnealing buffer (20mM Tris-Ac、2mM Mg-Acetate、pH7.6) でサンプルを懸濁してパイロプレート (PSQ96 Plate low、Pyrosequencing AB、Sweden) に移す。
8	各ウェルに10pmol のSequencing primerを加えて80°C、2分間の加熱後に室温まで静置する。
9	パイロプレートをDNAシーケンサー (PSQ96、Pyrosequencing AB、Sweden) にセットしてシステムを起動する。

表5. データベースに登録されているくり返し配列 (VNTR) の塩基配列

遺伝子	Pyrosequencing 開始からVNTR領域終了以降までの塩基配列
pX01	129900- TT AATAATAATAATAATAATAAT AACGG -129930 <div style="text-align: center; border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px;">AAT 繰り返し領域</div>
pX02	75497- TT ATATATATATAT CAAAAGAA -75520 <div style="text-align: center; border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px;">AT 繰り返し領域</div>
vrrA	546- CGGGTATTG TTGTTGATATTG TTGTTGATATTG TTGTTGATATTG TTGTTGATATTG C -490 <div style="text-align: center; border: 1px solid black; width: fit-content; margin: 0 auto; padding: 2px;">TTGTTGATATTG 繰り返し領域</div>

pX01 : ACCESSION No. AF065404
pX02 : ACCESSION No. AF188935
vrrA : ACCESSION No. L48553

表6. パイログラムによりくり返し配列 (VNTR) を確認した炭疽菌株

菌株名	Pyrosequencingを行なったVNTR保有遺伝子		
	pX01	pX02	<i>vrrA</i>
PAI	7	11	4
PAII	7	11	4
PAII (CBA99001)	7	11	4
PAII (CBA99004)	9	8	4
Sterne 34F2	8	-	4
Davis (CBA99003)	7	11	4
Davis (CBA99006)	9	8	4
Davis (CBA99007)	-	7	3

炭疽菌の各種抗菌薬に対する薬剤感受性試験

分担研究者：国立感染症研究所細菌第一部 渡辺治雄

協力研究者：国立感染症研究所細菌第一部 廣瀬健二

炭疽菌に対するニューキノロン系抗菌薬の薬剤感受性試験を行った。炭疽の治療に有効とされているシプロフロキサシンのMICは、 $0.032\sim 0.25\ \mu\text{g/ml}$ であった。また、レボフロキサシンもMICは $0.064\sim 0.125\ \mu\text{g/ml}$ と低値であった。その他のニューキノロン系抗菌薬では、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は $0.5\sim 2\ \mu\text{g/ml}$ と高い株が見られた。今後これらMICが $0.25\sim 0.5\ \mu\text{g/ml}$ と高い株に感染した場合に、その治療にニューキノロン剤が有効かどうかを動物実験などで検討する必要があると考えられる。

炭疽菌による感染症では、抗菌剤の投与による治療が行われている。大多数の炭疽菌はペニシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン等多数の抗生物質に感受性を示すため、治療は抗生物質投与が中心となる。日本では、かつてはペニシリンを第一選択薬としていたが、ペニシリン耐性の炭疽菌も出現していることから米国FDA(食品医薬品庁)はニューキノロン系抗菌剤のシプロフロキサシン、代替薬としてドキシサイクリンを推奨している。

日本国内では、シプロフロキサシン以外にも様々なニューキノロン系抗菌薬が発売されている。ノルフロキサシン、オフロキサシン、レボフロキサシン、スパルフロキサシン、ロメフロキサシン、塩酸エノキサシン、トシル酸トスフロキサシン、フレロキサシン、メシル酸パズフロキサシン、ガチフロキサシンと現在国内で使用可能なニューキノロン系抗菌剤は11

薬剤となっている。本研究ではシプロフロキサシン以外の主なニューキノロン系抗菌薬の炭疽菌に対する抗菌作用を検討するために、炭疽菌を用いて薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験はEtestを用いて、ニューキノロン系抗菌薬7剤を含む30薬剤に対して行った。菌株は、当研究所に保存してある炭疽菌弱毒株11株を用いて検討した。ただしこれらの菌株は、分譲元の異なる同一の株を数株含む。感受性試験はMICを測定する方法で行った。MIC ($\mu\text{g/ml}$)の結果は表1の通りであった。炭疽の治療に有効とされているシプロフロキサシンのMICは、 $0.032\sim 0.25\ \mu\text{g/ml}$ であった。また、レボフロキサシンもMICは $0.064\sim 0.125\ \mu\text{g/ml}$ と低値であった。その他のニューキノロン系抗菌薬では、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は $0.5\sim 2\ \mu\text{g/ml}$ と高い株が見られた。ペニシリ

ン系抗菌薬では、アンピシリンのMICは低値であった。アズトレオナム、ST合剤および第3世代セフェムであるセフォタキシムとセフトリアキソンには耐性を持つ株が見られた。また、代替薬として推奨されているドキシサイクリンのMICも非常に低値であった。米国でバイオテロに使われた炭疽菌の各種抗菌剤に対するMICが報告されているが(1)、その値は今回の私たちの実験結果とほぼ同じようなMIC値を示していた。ニューキノロン剤が効きにくいニューキノロン低感受性菌がチフス菌、パラチフスA菌、赤痢菌などで出現し、治療上の大きな問題となっている(2,3)。チフス菌・パラチフスA菌のニューキノロン低感受性菌では、各種ニューキノロン薬のMICは0.25~0.5 μ g/mlを示し感受性試験では感受性と判定される。しかし、実際はニューキノロン薬の投与では治療ができないことが報告されている(2)。米国での炭疽菌のMICについてはシプロフロキサシンの値しか示されていないが、我が国では他のニューキノロン薬が臨床で多く使用されている。今回検討した炭疽菌も、一部のニューキノロン薬に対してはMICが0.25~0.5 μ g/mlと高いものがあり、低感受性を示すことが予想される。しかし、MICが0.25~0.5 μ g/mlの炭疽菌に対して、これらの菌に感染した場合生体内でニューキノロン剤は効果があるのか否かは、現在のところ動物実験等のデータがないので不明である。今後こ

れらMICが0.25~0.5 μ g/mlと高い株に感染した場合に、その治療にニューキノロン剤が有効かどうかを動物実験などで検討する必要があると考えられる。

参考文献

(1) Update : Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax and Interim Guidelines for Exposure Management and Antimicrobial Therapy, October 2001. MMWR, 50 (42) : 909-919, 2001

(2) 足立拓也 増田剛太 今村顕史 味澤篤 根岸昌功 高山直秀 滝永和美 高野さかえ ニューキノロン低感受性腸チフスの2例 感染症学雑誌75 : 48-52, 2001

(3) 坂本光男 相楽裕子 ニューキノロン低感受性腸チフスの1例 第49回日本感染症学会東日本地方会抄録2000年51頁

表1 炭疽菌の各種抗菌剤に対する感受性

	MIC range	90%MIC	
ペニシリン系			テトラサイクリン系
Ampicillin	0.016-0.032	0.125	Tetracycline
Penicillin G	<0.016-0.5	0.25	Doxycycline
Amoxicillin	0.032-0.5	0.25	
合成抗菌薬(キノロン・ニューキノロン剤)			クロラムフェニコール系
Nalidixic acid	2-32	16	Chloramphenicol
Ciprofloxacin	0.032-0.25	0.25	
Ofloxacin	0.125-1	0.5	モノバクタム系
Norfloxacin	0.25-2	1	Aztreonam
Levofloxacin	0.064-0.125	0.125	
Sparfloxacin	0.032-1	0.5	カルバペネム系
Fleroxacin	0.25-2	0.5	Imipenem
Greprofloxacin	0.032-0.5	0.5	
セフェム系			ホスホマイシン系
Ceftriaxone	8-64	32	Fosfomicin
Cefoperazone	2-16	16	
Cefotaxime	>32	>32	リンコマイシン系
アミノ配糖体系			Clindamycin
Gentamicin	0.064-0.5	0.125	
Kanamycin	0.5-2	2	抗結核薬
Streptomycin	0.064-6	2	Rifampicin
マクロライド系			
Erythromycin	0.5-4	4	その他
Clarithromycin	0.125-4	2	Vancomycin
Azithromycin	1-16	4	ST 合剤

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 井ノ上逸朗 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨

バイオテロ対策の一環として、微量試料からの炭疽菌検出のみならずさまざまな病原体を迅速に検出・診断するシステムを構築する。96穴プレートにさまざまな病原体遺伝子を検出するPCR用プライマーセットを準備する。あらかじめDOP (degenerate oligonucleotide primed)-PCRにより全ゲノム増幅したサンプルを96穴プレートに分注し、特異的PCRで増幅したサンプル（この時点である程度の診断可）をPyrosequencingにて塩基配列決定し確定診断をおこなう。非常に感度の高い手法であり、*Escherichia coli*では20菌体相当のDNA量を検出可能である。病原微生物を培養する必要がないので6時間以内という短時間で確定診断ができ、多くのプライマーセットを準備することによりさまざまな病原体に対応できる。バイオテロの可能性として、既知の病原体のみでなく遺伝子改変病原体が使われる可能性も考えなければならぬ。その際はホストとなる微生物の検出を試みるなど、対応できるシステムを構築する。また、このシステムはバイオテロだけでなく、現在のペットブームに伴い横行している密輸入ペットから広がる可能性のある、または検疫所にてチェックを受けないウイルス（またはそれ由来の不審物）からの感染の防御もしくは早期発見・対処上での利用も可能と考えられる。

A. 研究目的

一昨年、米国が経験した炭疽菌バイオテロ事件は、バイオテロの危険性を衆知させた。と同時に、すでに化学テロを経験している我が国でも同様の生物テロが発生する可能性が現実のものとなりつつある。従って、その対応策として病原体の検出法、滅菌法及び新規治療法の開発が強く望まれている。バイオテロを想定す

ると、最初に原因微生物がなにであるかの特定、すなわち迅速で確実な診断が求められる。微生物の種類のみならず、菌株や遺伝子改変微生物等の情報も同時に得られる診断システム確立により、危険度の推定、治療法の選択に繋がる。ユニバーサルなバイオテロへの対策を準備することは、バイオテロへの抑止効果に繋

がるであろう。

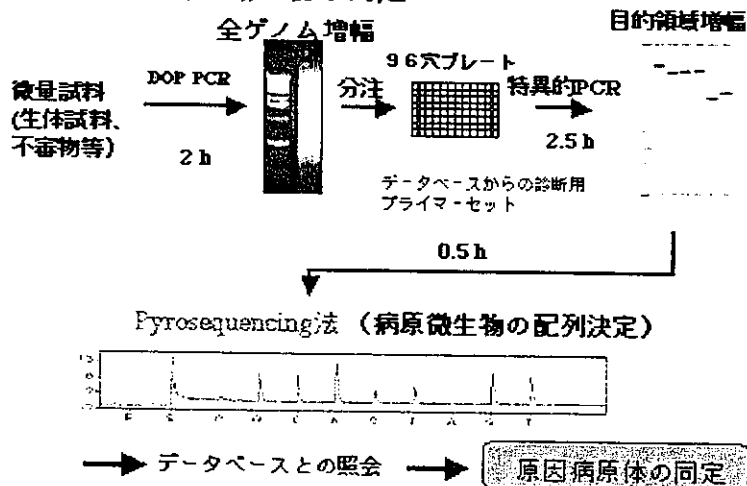
また、日本はアメリカと並ぶ世界有数のペット市場であるにも関わらず、日本は輸入動物に対する警戒心が薄くまた予想される感染症についても知識不足であり、現行の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」通称、感染症法に基づいた動物検疫所での検疫対象動物種や、検疫項目の数が少ないといったように、輸入動物由来の人獣共通感染症への対策が徹底していない。バイオテロへの対策におけるこの不審物の迅速判定法は、ペットからの人獣共通感染症由来の不審物の迅速検出においても役立つと考えられた。

今回は、バイオテロの対策としても加えている天然痘ウイルスやフィロウィルスといった動物検疫所でチェックされる病原体とともに、チェックされないものとして今問題となっている B ウイルスを網羅した形での作成を試みる。

B. 研究方法

各種病原体に対応する迅速診断法の確立が本研究でもっとも重要な位置をしめる。バイオテロを想定した場合、病原体の特定がもっとも重要であり、炭疽菌に限らず多種の病原体に対応できる迅速診断システムの開発が期待される。同時に微量サンプルから迅速、確実に診断するシステムが求められる。微生物検出の流れは、微生物 DNA を全ゲノム増幅する DOP-PCR にかける、そして微生物に特異的な PCR 反応をおこない、プロダクトを Pyrosequencing 法にて解析する。Pyrosequencing 法により短い塩基配列を得ることができ、PCR に用いたプライマー情報と合わせると病原体の確定診断が可能となる。本手法により、培養することなく最初の PCR から確定診断までを 6 時間以内でおこなうことができる。

図1.未確定病原微生物の同定



B-1) 試験菌体の選択

最初に病原性のない大腸菌を用い、検出系の確立のための予備実験に用いる。そしてウイルスを含めた幅広い病原体検

出システム構築のためいくつかの細菌、ウイルスを実験に用いた。今回使用した微生物リストを表1に示す。

Table 1. 今回の研究に使用した DNA リスト

(細菌)	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Bacillus anthracis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Escherichia coli</i> K12
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
(ウイルス)	<i>Hepatitis B virus</i>
	SV40
	Zaire Ebola virus
	Reston Ebola virus
	Sudan Ebola virus
	Marburg virus
	Variola virus
	<i>Cercopithecine herpesvirus</i>

実際に用いた病原性のない大腸菌、他の細菌、そしてウイルスを選択した。

また、実際には研究に用いてはいないが天然痘やエボラウイルス、B ウイルスも加えた。

B-2) 解析する遺伝子、配列の選択

診断システム確立のためには解析する遺伝子の選択が鍵となる。細菌を対象とする場合についてまず述べる。それぞれの菌体に特異的な遺伝子配列を用いることにより菌体の検出が可能となる。しかしながら、遺伝子改変変異株の危険性もあり、特異的な遺伝子が改変され検出で

きない可能性もある。そこで熱ショックタンパク遺伝子など、すべての菌が有するが、遺伝子配列が若干異なる遺伝子をも診断に用いた。各々の病原体につき、共通、特異的遺伝子、それぞれ少なくとも5個を選択し、確定診断に用いる。次に、ウイルスを検出する場合には、それぞれに特異的な遺伝子を選定した。B 型

肝炎ウイルスでは surface antigen 遺伝子内で5カ所のプライマーセットを設定、SV40 では VP1 major structural protein 遺伝子配列から5カ所でのプライマーセットを設定した。
また、バイオテロの危険性とペット由来の人獣共通感染症の原因としても知られる天然痘ウイルスと、フィロウイルス(マールブルグ病とエボラ出血熱。エボラに関してはサブタイプ別に作成。)に加えて、海外から野生動物を輸入した時に検

疫所で検査されない B ウイルスに関しても、同様にプライマーセットを設定した。それぞれの特異的な部位としては、フィロウイルスにおいては DNA polymerase をコードしている L gene、天然痘ウイルスにおいては B26R gene、B ウイルスにおいては、DNA polymerase をコードしている部位において作成した。

病原体検出のために用いた遺伝子とプライマーセットリストは表2にまとめた。

表 2. 病原体検出のためのプライマーセット

1 すべての菌に共通の遺伝子の配列

Gene name	Bacteria name	PCR primer	Sequence
dnaK	<i>Escherichia coli</i>	1F TCAAGAAAGATCAGGGCATTG	CAGCGCNC <u>TGAAAGAAGCGGCAGAAAAAGCGAAAAATCGAA</u> TGAACATCAAAGTGACTCGTGC <u>GAAACTGGAAAGCCTGGT</u>
		1R CGTCTTTTACGTCACCACTCA	ACGACGTTATCCTCGT <u>TGGTGGTCAGACTCGTATGCCAAT</u>
		2F ACCAGTCTCGGGTAACCATC	AAGTTACCTTCGATATCGATGCTGACGGTATCCTGCACGT
		2R CAGAGCAGTTTCCAGTGCA	
	<i>Bacillus subtilis</i>	1F AAGACAAAATGGCGCTTCAG	CTGAAAAAGCGAAAAAAGATCTTTC <u>CGGGCTATCTTCTAC</u> GCTAAATTCGAAGAGCTTTC <u>TCTCTCATTTAGTAGAGCGCA</u>
		1R ATCCGGGTTTACGCCTTTAT	GTAGAGCGCACAAATGGGCTCTGTC <u>CGTCAAGCGCTTCAAG</u>
		2F GATCGACCGCAACACGAC	CACTCGGCCGCTTCCAGCTTACTGATA <u>TCCCGCCAGCACCC</u>
		2R CGTTTTTCTCAATCGCTGCT	TCGTAAACGTAAGAGCAAAAGAC <u>TTAGGCACAGGAAAAGA</u>
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1F GAAGCTGCTGAAAAAGCAAAA	GCAAAATTTAATGAATTGACAGAA <u>GGCTTAGTTCAAGATA</u> CTATAGAGCCAATGAAAAAGCAC <u>TTAGTGATGCAGGACT</u>
		1R GGGTTAACACCCCTTTGATGG	AGTTCAAGAAGCAGTTAAAACTATA <u>CAGGAAAAGATCCA</u>
		2F GCAGCAGATAATCAACCATCA	AATGGCTGCTGATAATAAGAGCC <u>TTGGAAGATTTACTCTT</u>
		2R GAGCTCCGCTTTGCTCATAC	GCCTTGGAAAGATTTACTCTT <u>GATGGTATAGCACCAGCACCC</u>
1F TGGCAGAGCAGTACAAGGAG		AATGANNTAAGGATATACTAGAA <u>AGATCTGAAACCTGTCA</u>	

			AGAGCTTCAACTTTTAGCAGAAAGAGTGAAGAAGACTTTA
		1R ATGCGAGATGAGCCTCCTAC	CTATATCAA TTAATTA CGAGGGAGAAAGGCCNNNNNNNN
		2F AGTATAGATGAAAATGTGGTTGAGG	NNNGGGTAGCAGATGATACAGGTTATACTCTATCAGCAGT
		2R GGTCTTTTCCTTAATTAATGAAGCTTG	AGTCAA TGTTGT GAGTAAAAGTTTTGGAGTTGTAACGTAT
		1F GAAAAGTTGGCGTAAATCCA	TAATGATATTC TGT AAAAATGTGAAAATGTGAAGAAGCAN
		1R CGCTTCATCAACATTTATTCCA	GAATGCCTATGGTACT TGATTT TATAAAGAAGTGAGTAA
		2F GCTCCAAGGTGAAAGTGAAGA	TTCTTGAAAAATA TGTTTT TATGATATAGAAATATGTAGG
		2R TTCCTAAAAGGCTCGGACA	TTCAAAAACCTTTG TGGATT CAATTGANNTGAAGGTAGTT
		2R TTCCTAAAAGGCTCGGACA	AATATTTAGAGCCATAGATGTTT GAAAA AGGCAGATGTG
	<i>Helicobacter pylori</i>	1F CGAAACGGGCATTGAAATTA	CCTAAACACT TTGGTT AAAAAACTCACTAGGCTAAATTTG
		1R AACGCTTTCACCTTTCTTG	AACCAAAAATGAGANNNT TT CAGAAGTGGTATGGTGGGA
		2F AAGTGTCTCAACCGCTGAAG	AGCCCGCTGTGTCATTA TGTTTT TACAAGGCGAGAGAGA
		2R TTGTCTTCAAGCTCCGCTT	C TTTGGT AAATTTGA TTTG CAAGGCATCGCTCCAGCTCC
		2R TTGTCTTCAAGCTCCGCTT	TCTGATAGGGAAAT TGAAAA ATGGTGAAGACGCTGAAT
	<i>Bacillus anthracis</i>	1F TCCTTCTGCACCTTCTGCTT	TCTCAATCGCAGC TTGT AATGCTCTTTTCGCTTCTGTTC
		1R AACAGACCTTCCACCAGCAC	TTCTAAATC TTTT TACAACCTTATCTGTCTGGAATACAAGT
		2F TTGAACTGCAGCACCTAACG	CGTTACGAAG TTCA ACITCTTCTTACGTTTTTGGTCAGC
		2R CCAAGATAAAATGGCGCTTC	ACGTTCTACT TTCT CATCAGAAAGACCTGAAGAAGATTGG
		3F CTGCTGCTGTTGGTTCGTTA	ATTGTAATAGCTGCT TTT GCTGTCTCTAAATCTTTCC
		3R GCTGTTATGGAAGGTGGAGAA	TACCAAGTTTACGTT TAATA GCTTCTTGTACAGCTGGGAT
		2F TTGAACTGCAGCACCTAACG	GGATAACTTTATCTAAT TCAC TTGGAGCAAACCAGCGTC
		2R CCAAGATAAAATGGCGCTTC	TC TTT CAACAAGACCTGCTGAAAGCTCTTCAATTTTCGCT
		3F CTGCTGCTGTTGGTTCGTTA	C TTGTT AATGTTAATTC AAA TGTAATGGACCAGCAGCTC
		3R GCTGTTATGGAAGGTGGAGAA	TC TTTT TCGCT TTTT TCAGCTGCATCTTCAACGTTGAA
		3F CTGCTGCTGTTGGTTCGTTA	TTCGTTAA TGAT ACGCTCAACTCTAAACCAGCGATACGA
		3R GCTGTTATGGAAGGTGGAGAA	ACGTTCTGCATCG TTGA AGTATGCAGGTA CTGTA ATAACA
		3F CTGCTGCTGTTGGTTCGTTA	CTGTTTCACTAAG TATG CTTCAGCAGAAGCTTTAAGIT
		3R GCTGTTATGGAAGGTGGAGAA	GTTTAAACAGACATG ATTG TATTTGGGTTTGAATTGCTTG
		3F CTGCTGCTGTTGGTTCGTTA	C TTGAC GCTCTTCA TTTT TGAAAGCTACAACAGAAGGTTG

2 各菌に特有の遺伝子の配列

Gene name	Bacteria name	PCR primer	Sequence
-----------	---------------	------------	----------