

HP0123	<i>Escherichia coli</i>	1F	ACTGCAACTACCTGGGGCTA	TACAACCAACTGACGGGAAGAGACAACGTTGCACTGGCAGC AATTATTCGCCAGGTGGCAAGCGCTCGGTGACGTTGAAC
		1R	GTCGCTGGCAATCACATACA	TGGGCTGGTGGTGAATGAAGATGACGAGATCTGAAATTA
		2F	ACAAACCCTTTGACCTGGTG	GATAAGCCTCATCCGGTAATGCGGATTGACGCGATTGCTA
		2R	TTCGGTGATCGTGATTA	ATGATGGGGATGCAGATGCTAATGGAGAAATATGGCGATC
ybcH	<i>Bacillus subtilis</i>	1F	GGAAATGAACTCGTTTGATCG	CTCGTTTGATCGTAAAAATATGGAATGTATAAAAAACTA
		1R	CAGTTTACCGTTCTTGAGACC	AAGAAGTTGAGAAACCCATTCAGGAAATGTTGATTTTT
CAC0551	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1F	TCCTGATAGTTGGTGCAG	TGCAAGCTATTCAATTAATATTTGAAAAATCAAACTACT AGATGAACCTGTAGTGGGTGACACAGATACTCTTATAGCT
		1R	AATATGCATTTCCGGTTCCA	GGAGTTCAAGTGATTCATCCGTAGCGAGCGTAGATAAAAC
HP1124	<i>Helicobacter pylori</i>	1F	TCCCTTTTATCGCTCCCTTT	TTCTCAATGGGGAGCCTTCAGCGTTTGATTTGCAAGTGG
		1R	AAGGCGATTTGTAAACCAA	CTAATATTTTGACCAAAATCCAATTCGCAAGTAGAGGCTAA
		2F	CAAACGCTCCGGCTAATAAA	CTAAGCAAAAAGAGATCTTTCAAGAAGCTCTGTCTTTTT
		2R	TTTTTGCGCCATTTAGCTT	TATGTGCGTTATGTTCTTGGAGAAGTGGCTTATGGGGAAA
shiga toxin	<i>Escherichia coli</i>	1F	TCCCGGGAGTTTACGATAGA	CAGAGATATCGACCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGAC ACCACACCCACCGGGCAGTTATTTGCTGTGGATATACG GTCTATCAGGCGGTTTTGACCATCTTCGCTGATTATTG AACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAGATTTTACACATATA
		1R	TGACGACTGATTGCATTCC	TCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTTCCATGACAACGGACA
		2F	TCTGGCGTTAATGGAGTTCA	CTGCGTTTGTCACTGTCAACAGCAGAAAGCCTTACGCTTCA CGTCAGGCACTGCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGA ACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGT TAATAATATATCAGCGATACTGGGACTGTGGCCGTATA
		2R	AGGCCTGTCGCCAGTTATC	CTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCTTCTGTTCCGCCCG
S-layer	<i>Bacillus anthracis</i> (chromosome)	1F	CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT	TCAATTCAATGCTAAGACTGACAAAGCAGTTCCGGTACAGAA AAAAATTAACATAAAGAAGATATCAAAGTAACTAACAAAGC CTAACAAAGCTAACCAACGATAAAGTACTAGTTAAAGAGGT AGTTGAATTATATAGTAACCTTAGCAGCTAAACAACTTAC ACTGTAGATGTAACAAAGTTGGTAAAACAGAAGTAGCTG TGGTAAAACAGAAGTAGCTGAGGTTCTTTAGAAGCAAAA AACAGTTGTAGCTGATGAGCCAACAGCAATTAACAATTCACA

		1R	TTCTGCAGCTGGCGTTACAAAT	GCTGATGAGCCAACAGCATTACAAATTCACAGTAAAGATG AAAACGGTACTGAAGTTGTTCCACCAGAGGGTATTGAATT
Protective antigen		1F	TCCTAACACTAACGAAGTCG	TTTAAACCCAATGTTTCAGCCCAAGTTCCTCCCTGCTA GCGACCGTACTTGAATTCGAATFACTAAATCTGCAGATA AACGACGCATGCACITCTGCATTTCCATGTACTTCACTAG GTATTTTACTTAATGTTCTCGTTTGACTATCAGTATTCT CATATCTACATGTACAATCGGATAAGCTGCCACAAGGGGG TGCTTGCCCTCTGGTGATACATTCTTATCAATCCGTCCTG
		1R	GAGGTAGAAGGATATACGGT	TACGGATCAGAAGCCGTCCTCCATTTTTCAGGAGATGATT
Lethal factor	<i>Bacillus anthracis</i> (plasmid : pX01)	1F	GCGGTCATGGTATGTAGGT	CACAGGAAGAGCATTTAAAGGAAATCATGAAACACATTGT AGGAAGCTGTTAAAAAGAGGCAGCAGAAAAGCTACTTGA TAGAGATGTATAAAGCAATTGGAGGAAAGATATATATTGT AGAAGCATTATCTGAAGATAAGAAAAAATAAAGACATT
		1R	AACGTTCAAGTGCCTTTTCAG	ACATGAACATTATGTATATGCAAAAGAAGGATATGAACCC
		2F	TCTCAAGAAGAAAAGAGCTTCTAAA	TACAAAATGATATTCGCTGATTCTTATCTGAAGAAGAAAA AATAGAATACAGGTGGATAGTAGTAATCCTTTATCTGAAA GGTTGCAAGATACAGGAGGGTTAATTGATAGTCCGTCAT AGTATAAAAGGGATATTCAAAATATTGATGCTTTATTACA TCAA TCCATTGGAAGTACCTTGATCAATAAAATTTATTTG
edema factor		1F	GACCTCAAAATTATCCGTTTCA	TTTTGATGTTAGAAAGCAATTGAACTTGATTGGTAATCC TATTTGTTAGATTTTAGAACATTTTCAAATTCATTATAG CGCTTTTTCCTGAGAAAAATATGATTTGCTGAATTGT AATAGCTGACAAAATATCCTGCAATTTTTTTCACGCTTTC TGTCGCCACTATCTTTATAAACTCCTACATTTGAAGATCT
		2F	TCGTTGTTTCATCGCTAATTC	TTTTTACCATTATCAATTTCTTTTTACCCTTCAAATTT CTTTTTACCCTTCAAATTTATCCCAATTTTCCTTAACTC ATTTACCTTCATGCTCTGTAATTGATTTTTATTTCTA CTCGACAGCTAATTTGTGACCATGCTTCTTAGATAAATCT AATCCCTTTGTAGCCACACCACATTTTAAAGGTTGTGAG
CapB		1F	GCTCAGCTGCACCATGAATA	AATATGGACGCATACGAGACAATAATTCACCTGTTGACCA TTGTTGACCAGCCTTCTAAGTTCCAATACTCTTGCCTTGG

			<p>CTTGCGTTGGAATATCTCCTTTTTCAAAGCACTTGTAAAT</p> <p>CACTTGTAAATAGGTGCAGTCGTTTCTCCAATCGCAATAAC</p> <p>TCGCAATAACTATTTCCGCTTTAAATATATGGCAAACATC</p> <p>GCAAAACATCCCTAGCAAAC TGCTCAGTACGATCAACGCG</p>
CapC	<i>Bacillus anthracis</i> (plasmid : pX02)	<p>1R GGAACGTGTGGATGATTTT</p> <p>1F GCAAATGTTGCACCACTTAACA</p> <p>1R TGCAGGTTTAGTTGTACCTGGTT</p>	<p>AACTCCAATACCACGGAAATTCAAAAATCTCAAATGGCATA</p> <p>AAATGGCATAACAGGATAACAATAATCAAATAAAAGTTTT</p> <p>TAAAAGTTTTAAACAATACTGTAATTAGCGTTGCCGCA</p> <p>CGTTGCCGCAAATTTTCTACGGCCATATAAAATCATGAAT</p> <p>AATCATGAATCTTGAACACCATACGTAACGATTACATAT</p>
MO		<p>1F GCACTGGCAACTGGTTTTG</p> <p>1R GACGGATTATGGTGCTAAG</p>	<p>AGATAATCCCTTGC77ATACACATCAAAGATTGAAGTAC</p> <p>TTCTGTCTAGGACTCGGTTTTATTATCGTATTCTCCCCC</p> <p>AAGATCAGCATTACTTTTTTAGGATCCTTTGCCTTACTA</p> <p>TGCCTTACTAA77GCTTAAGTAATACATCTGGGTTACATA</p> <p>TTTCGTTGCAA7AGCTCCTGCTACAAATGCATCTGTAAT</p>

HP0123,HP1124 : Hypothetical protein gene

ybcH : ygene

CAC0551 : Uncharacterized protein with possible cell attachment and effacing function  
: Cell-adhesion domain;

### 3 ウイルス用

Surface antigen	<i>Hepatitis B virus</i>	<p>1F GATTCCTAGGACCCCTGCTC</p> <p>1R AAAGTGTGAGCCAGGAGAAACG</p>	<p>TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGA</p> <p>AAATTCGCAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCT</p> <p>TTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTC</p> <p>TTGGTCTTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTC</p> <p>AGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGC</p>
VP1 major structural protein	SV40	<p>1F AGCTGCTGCTGCTACTGGAT</p> <p>1R CCAATGTCTGGGGTCAAGAT</p> <p>2F TCCTAGGCTCACCTCACAGG</p>	<p>TTGCTGCTATAGGCCTCACTCCACAGGCCTATGCTGTGAT</p> <p>TAGCTGGATTTGCAGCTTTACTGCAAAGTGTGACTGGTGT</p> <p>GAGCGCTGTTGCTCAAGTGGGGTATAGATTTTTTAGTGAC</p> <p>TATCAACAACCAGGAATGGCTGTAGATTGTATAGGCCAG</p> <p>TATAGGCCAGATGATTACTATGATA7777ATTCTGGAG</p> <p>AGGTTTTTAGAGGAACTACT77GGACAGTAATTAATGCTC</p>

			<p>TTACAAGATTACTACTCTAC TTTGTCTCCATTAGGCCTA</p> <p>AACAGGGAAGGGTTGCAAAATA TCATTTGGGCACACCTATG</p> <p>AAGTAACTGAGAGGTGGGAAGCTCAAAGCCAAAGTCTAA</p> <p>GGTGGTGCAAACTCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGC</p>
L gene	<i>Reston Ebola virus</i>	<p>2R ACTTGCACTGGTTCCTTTGG</p> <p>1F TCGAACTTCGGAGATCCTG</p> <p>1R CAAATCCACCGTGCAACTAA</p>	<p>AAATCCAGGAAATTGTAGTGCCATTGATTTTGTCTTAAAT</p> <p>TGTCTTAAATCCATCCGGATTAATGTTCCAGGATCACAA</p> <p>GCTGATTTGGAAGATGAGATGGTTTGTAA GTGGCTCCTTT</p> <p>TCCAAAATCATAAACAACAA CAGTGAGACACCTGTA CTG</p> <p>CTACAAGATGGAATCTGTGGTTCAGTTATTTGGACCATT</p>
	<i>Zaire Ebola virus</i>	<p>1F ACCGGAATCTAGGAGATCCA</p> <p>1R AGCCCATGAATATCCCTCA</p>	<p>TGGGAATGCACTGCCATTGACTTTGTGCTAAATCCTAGC</p> <p>AAATCCTAGCGGATTAATGTCCCTGGGTCGCAAGACTTA</p> <p>TTCGAAGACGAAATGGTTTGTAAATGGCTATTATCATCAA</p> <p>AGCCTCTAAGATCATCAACAATAATCAGAGACACCGGTT</p> <p>AACATTGCAAAGTGGAGCCTATGGTTTAGTTATCTTGAT</p>
	<i>Sudan Ebola virus</i>	<p>1F TTTATCGCAACCTGGGTGAC</p> <p>1R CCTAATTGGTTGAATTGCTCC</p>	<p>TCCAGGGAATTGTAGCGCAATGACTTTGTTCTAAACCCA</p> <p>TCTAAACCCAGGAGGGTTAAATGTCCCTGGATCACAGGAT</p> <p>GATCTTGAAGATGAATTAGTTTGTAAATGGTTACTTTCTT</p> <p>ATTAGCATCTAAATGATAAGCAATAATGCAGAGACACCA</p> <p>GATAACACTTCAAAGATGGAATTTATGGTTTAGTTACCTA</p>
	<i>Marburg virus</i>	<p>1F CAAATTTAGACAATAAGGCTGAG</p> <p>1R TTGAGAAAAGAGTTCATGCTC</p>	<p>ATCCCGTTTTATACAATGATGTTGCAC TAGATAAGGTTAA</p> <p>ATAAGGTTAAAAACATGCGCAA TCGACAAAAATCTTAAA</p> <p>AAATCTTAAAACTAAAGTCATGTTTGAAACTTTTGTGT</p> <p>ATAGTAGCAAAGAATCATTATCA TTCTCAAGGATCATGGT</p> <p>TCATTCTCAAGGATCATGGTATAAA ACCACACATGATTTG</p>
B26R	<i>Variola virus</i>	<p>1F GTTTGACGCCTGGAGAAGAC</p> <p>1R AAAGTATCCATGTAGCTGTTT</p> <p>2F TTCCACCTAGAGATAGTCAACCAA</p> <p>2R ACTGGCTTCTCCTGTCCTGA</p>	<p>GATACATATTCACCTTCTCAAC TACCAAAAATTGAACCAG</p> <p>ATTGAACCAGAATATGCGGAGGTAGGTAATGGCTTACCCA</p> <p>TAAAAAAGATCAAATGAGCAAGGACGAAAAATA TTCGAA</p> <p>CCTATATCTAAACACATCAAATTTAGTT TTAGAGTATCAT</p> <p>GCATGGTGAACCAGAATCCACTAAATCAATA CCATCTGAT</p>
DNA polymerase	<i>Cercopithecine herpesvirus 7</i>	<p>1F GAACAGATTTTGTAAATCCGTTTG</p>	<p>CGCGTTGTCTAGACGAAAAACGACAGTGGTATTAACCCGG</p> <p>GGTCAATGTAAACAGAAAACCTAAAATA TACTACGATGGAC</p>

			TTTAAACACAACACGTTGGCCACGTCGAGTGAGCAATTGGA
			GCTGATATATGCGATTCTCGTTTCGCAACCGCTACCC
	1R	GGCCAATAATCCCCTAGTT	CAGTATTTTTATATGAACAAGTTGACGTGGATCTTGTTT

それぞれの細菌、ウイルスにおける PCR プライマーと、確認されるシーケンス近傍の配列を示している。このなかの表記においては、パイロプライマーの位置に下線、斜体部分がパイロシーケンシングによって確認される配列としている。

### B-3) データベースについて

近年、細菌のゲノム解析が盛んにおこなわれるようになり、データベースに遺伝子情報が蓄積している。主に用いたデータベースは NCBI Nucleotide blast であった。炭疽菌については、米国 TIGER 研のデータベースに遺伝子部分配列ごとにブラストサーチすることにより、遺伝子配列を得ることができた。われわれの材料での DNA 配列の確認から、データベース配列と異なる塩基配列をみつけた。変異が生じたのか、データベースのエラーかははっきりしないが、微生物あたり 5 カ所でのプライマーを準備しそれぞれの配列を確認することで、データベースからの塩基配列差異に備える。

### B-4) 全ゲノム増幅 PCR 法

Degenerate oligonucleotide primed-PCR (DOP-PCR)はゲノム全域を増幅する PCR 法で、2 時間の PCR 反応でゲノム全域を 1 万倍ほどに増幅できる。DOP-PCR に用いるプライマー (5'-CCGACTGAGNNNNNNATGTGG-3')は、5' 末端と 3' 末端の配列は一定である

が、間はランダムヘキサマー配列となっている。DOP-PCR プライマーは、1 本鎖に変成したテンプレートにゆるい条件 (low stringency) でアニーリングさせ、プライマー結合部位に確率的にハイブリダイズさせる。プライマーの結合部位の間隔は、3' 末端の決められた配列の長さ、アニーリング条件のきつさ (stringency) によってコントロールできる。3' 末端の決められた配列の長さ、アニーリング条件のきつさ (stringency) によってコントロールできる。特異的な PCR 反応ではないので、どのような配列でも増幅され、微量サンプルの 1 次増幅には適している。その後の遺伝子配列決定は問題なくおこなうことができる。感度のいい方法なのでコンタミネーションによる非特異的増幅が心配されるが、最終的には Pyrosequencing 法により塩基配列を確認するので、その点は問題はない。

### B-5) PCR

DOP-PCR で増幅したサンプルについて、病原体に特異的なプライマーを用い

通常の PCR をおこなう。増幅したサンプルは Pyrosequencing 反応をおこなうので、プライマーの一方は 1 本鎖精製のためにビオチンラベルされている。この段階でプロダクトサイズの推定から（図 1）、目的の病原体の存在はほぼ確認できるものの、確定診断にはいたらない。

#### B-6) Pyrosequencing 法

ビオチンラベルされたプライマー側のストランドを精製し、一本鎖とする。そこにシーケンスプライマーをアニールさせ、シーケンス反応をおこなう。目的配列にしたがい dNTP を加え（アデニンに対しては dATP）、dNTP が取り込まれる際生成するピロリン酸を Sulfurylase 酵素反応により ATP に変換し、ATP を基質としルシフェラーゼ反応をおこなう。そしてでてきた化学発光を瞬時に検出し配列決定ができる。過剰の ATP は apyrase により分解し、次のシーケンス反応に備える。化学発光によるシーケンス反応なので、瞬時にシーケンスを得ることができる。現有機器で、最大 7 塩基までの配列決定が可能であり、データベースの情報から病原体の同定・鑑別が可能である。

#### C. 研究成果

米国で炭疽菌バイオテロが発生したものの、炭疽菌のみがバイオテロの材料とは考えられず、これからはむしろ他の病原体の可能性の方が高いかもしれない。

事実、米国厚生省疾病管理・予防センター（CDC）ホームページにおいてはリシンや VX ガス、炭疽菌と並んで天然痘があげられており、各国が天然痘によるバイオテロ対策として天然痘ワクチンの確保に乗り出している現状がある。現実的なバイオテロへの対策としては、こういった各種病原体を迅速に確定診断するシステムが求められる。数多くの病原体を診断できるシステム構築によりバイオテロ対策のみでなく、バイオテロ抑止効果も期待できる。バイオテロ対策の一環として、病原体がなんであるか、を迅速に診断する手法の開発が本研究の骨子である。本研究の特徴は以下の 4 点である。

1) DOP-PCR を採用することにより微量サンプルでも培養ステップなしに検出できること。2) Pyrosequencing 法により塩基配列決定をおこなうので、確定診断が可能であること。3) 各種病原体を検出するためのオリゴプライマーを 96 穴プレートに配置しておくことにより、各種病原体に対応するシステム構築ができること。4) 全過程が 6 時間以内なので迅速診断が可能であること。

病原体検出の流れは図 1 に示す。DOP-PCR に 2 時間、特異的 PCR に 2.5 時間、そして Pyrosequencing に 0.5 時間、計 5 時間で微生物特定が可能である。*E.coli* ゲノム DNA を用いたシミュレーション実験により、0.1 pg の DNA から配列決定可能であった、菌体に換算

すると20菌体に相当し、非常に高感度検出法といえるだろう。したがって培養することなく病原体の特定が可能である。

本研究のポイントのひとつは病原体検出のためどの遺伝子を選定するかであった。それぞれの病原体に特異的な遺伝子を検出することにより、確定診断ができると予想される。しかしながら、例外的かもしれないが、データベースと手にいれた微生物との配列が異なる例があった。当然、複数のプライマーセットで対応しなければならない。微生物に特異的な遺伝子のみでなく、熱ショック蛋白(dnaK)など微生物(細菌)に共通して存在する遺伝子で、微生物ごとの若干塩基配列の差異を検出することにより、さらに確実な診断をおこなうことが可能となる。ひとつの微生物あたり最低5種類のプライマーセットを準備し、96穴プレートにのせた。

*E. coli* の変異株である *E. coli* O-157:H7 でも 抗生物質の効果は *E. coli* と同様と考えられる。遺伝子改変株によるバイオテロを想定した際、毒性を有する原因を特定できなくても、菌株の属や種を同定することにより、初期段階の治療方針をたてることが可能となる。今回のようにすべての菌に共通な遺伝子検出を行うことで、毒性を有する遺伝子本体が不明な場合でも、菌株の属・種が特定可能なので、一次的な治療法の選択が可能となるだろう。病原菌に特異的な遺伝子検

出のみでなく、すべての菌に共通な遺伝子検出により、毒性を有する遺伝子本体はわからなくてもホストとなる菌の同定が可能となる。そして初期も段階で治療法の選択が可能となる。

バイオテロとともに人獣共通感染症への対策もかねて、天然痘、フィロウィルス(エボラ出血熱:レ斯顿型、ザイル型、スーダン型、マールブルグ病)それぞれサブタイプまでを区別するためのプライマーセットを設計した。フィロウィルスに関しては、RNA ウィルスゆえに変異が多く、それぞれに対応させるためにPCRプライマーも個別に作らざるを得なかったが、このように細かくそれぞれに対応するセットを作成しておく事で、マールブルグ、フィロウィルス各サブタイプの特定制までが容易に行えると考えられた。現在、ペットブームに伴って海外より野生動物がペット用として密輸入されている。これらの動物は、検疫を受けないゆえにその動物から持ち込まれる危険性のある病原体による二次感染の可能性を入国段階で防げない恐れがある。今回設計したような検出するキットがあれば、これらの動物由来のエボラ、マールブルグウィルス等が他の動物に感染、媒介する機会をできるだけ減らす事が出来、また心無い人間によるテロ行為等に悪用され我々の日常生活が脅かされる可能性を防ぎ、また感染した場合もその早期発見が可能になると思われる。また、

現在検疫所で検査されない B ウイルスに関しては、他に PCR での検出を試みたグループの報告もいくつかあったが、今回我々はまた別の領域（DNA ポリメラーゼをコード）をターゲットにしてプライマーセットを作成した。これらを用いる事で、十分に不審病原体の診断が可能であることが確認できた。

#### D. 考察

すでに地下鉄サリン事件という化学テロを経験した我が国であるので、炭疽菌テロのようなバイオテロ発生の可能性を当然想定する必要がある。もちろんその対策も重要で、バイオテロ対策を講じることが抑止効果にも繋がる。

バイオテロが発生したことを想定すると、なによりもまず病原体がなんであるかを知ることが最も重要である。病原体を培養し確定診断をおこなうといった、従来型の細菌学的手法は当然おこなわれるべきであるが、診断までに時間がかかるのでごく初期の対策には役に立たない。本研究では、培養せず短時間でユニバーサルな病原体を診断するシステム構築を目指した。全ゲノムを増幅する DOP-PCR の採用により塩基配列決定、すなわち確定診断まで 6 時間以内でおこなえる。96 穴プレートを用い、そこに 96 種類のプライマーセットを準備しておくことができる。微生物各々につき 5 種類のプライマーセットを準備するので、1 枚あた

り 19 種類の微生物を鑑別診断できる。プライマーセットを増やすことで、対象病原体を増やすことも可能である。

今回の研究は、現実的にバイオテロ対策として適用でき、診断可能となるデータを得ることができており、バイオテロ対策としての実用性ある方針をたてることができた。将来のことを鑑みると、バイオテロの危険性として、遺伝子改変微生物の使用まで想定しなければならない。病原性のない微生物を強毒株に変異させバイオテロに使用される危険性である。遺伝子改変技術進歩により、いかなる可能性もあり得るだろう。現実上、未知の病原体に対しては対策のたてようがないものの、その都度、早急かつ適切な対応策を講じる必要がある。本研究では例えば、*E.coli*: K12 と *E. coli* O-157: H7 との鑑別を可能としている。*E.coli* を改変しなんらかの病原体を作成したとしても対応できる。

また我が国は、最近のペットブームに伴い野生動物の密輸が問題となりながらも、法改正や規則が追い付いていない。現行の感染症法においては、人から人に感染する病気を防ぐのみで動物からの感染を考慮し輸入規制できる規定がまだなく、動物から人への感染により中枢神経がおかされ、致死率 70%とされている B ウイルスに対する検疫は行われていない、などといった問題点がある。よって、密輸により検疫を免れてしまった野生動



物からのさまざまな病原体による感染がおこったときの、具体的な処置は義務付けられていない。昨年末にプレーリードックが野兔病やペストの媒介になっていることが発覚し、輸入がこの春から禁止になるなどの、2004年に予定されている法改正を待たずして少しずつ規制が設

けられるようになってきているが、このような現状においての今回の迅速検出法は有用と考えられる。(感染症法は平成15年2月現在ではまだ改正へ向けて検討中である。)

## E. 結論

今回の炭疽菌や天然痘だけでなく他の病原性微生物由来のバイオテロを想定した上での、ユニバーサルなバイオテロ対

策を目的とした本研究は、バイオテロ対策だけにとどまらず役立つ可能性があると考えられ、今後も継続される必要性を感じる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
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

分担研究報告書

各種消毒剤による炭疽菌芽胞の迅速的不活性化に関する研究

分担研究者 高木 弘隆 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

【研究要旨】

炭疽菌芽胞の不活性化に関して、過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素の3種類を用いて検討を行った。炭疽菌 I 菌株、34F2 株より調製した芽胞に対して過酢酸は0.05～0.1%で10分、次亜塩素酸ナトリウムは1000ppmで20分、硫酸で活性化した二酸化塩素は500ppmで10分の作用により10<sup>6</sup>CFU以上の芽胞不活性化効果が認められた。

【目的】

炭疽菌(*Bacillus anthracis*)は好気性有芽胞菌であり、環境中では多くの場合、芽胞を形成して多彩な環境変化に抵抗しており、このため熱などの物理的条件や消毒剤などの化学的条件に耐性を示す。しかしバイオテロなどで想定される「生活環境の広範囲な汚染」の除去は、もっぱら化学的処理による殺菌・不活性化に頼ることとなる。こうした芽胞不活性化に有効な消毒剤とその効果についての検索は非常に重要となるが、現在のところ炭疽菌芽胞の不活性化に関する詳細な検討や情報はほとんど得られていない。そこで今回芽胞の不活性化に有効とされる消毒剤を用いて、炭疽菌芽胞に対する不活性化効果を検討した。

【試験材料及び試薬】

以下のものを試験検討に用いた。

(1) 炭疽菌芽胞：

①パスツール I 菌株より調製（約 3.0×10<sup>7</sup>CFU/0.1ml）②34F2 株より調製（約 1.0×10<sup>8</sup>CFU/0.1ml）

両芽胞浮遊液ともに調製後4℃保存にて6ヶ月以上経過し、力価の低下が認められていない。

(2)トリプトソイ寒天培地：パルコア トリプトソイ寒天培地：栄研化学製（以下 TSA）

(3)過酢酸（Peracetic Acid）：シグマアルドリッチジャパン製；消毒剤

(4)次亜塩素酸ナトリウム：ピューラックス オーヤラクス製；消毒剤

(5)安定化二酸化塩素：ハイクローツ H-500 保土谷化学工業製；消毒剤

(6)硫酸溶液：硫酸(1+2) シグマアルドリッチジャパン製

(7)チオ硫酸ナトリウム：チオ硫酸ナトリウム5水和物 一級 米山薬品工業(株)製

(8)角型シャーレ：滅菌角シャーレ2号 栄研化学製

(9)残留塩素測定器：HANNA 製 HI93711 遊離・全塩素測定型及び同社製 全塩素測定試薬

(10)簡易迅速定量分析キット：RQ flex plus 及びリフレクトクアント過酢酸テスト Cat.NO.16976-1M

(11)塩素定性試験紙：ヨウ化カリウムでんぷん ADVANTEC 製

消毒剤としては作用の迅速性・低毒性及び取り扱いの面から上記の過酢酸、次亜

塩素酸ナトリウム、二酸化塩素の3種類を選択した。

#### 【準備及び方法】

##### (1)試験用炭疽芽胞浮遊液の調製

寒天培地を用いた好氣的培養法により芽胞を形成させ、これを回収し、洗浄・低温処理によりクリーンアップしたものを60℃、1時間加温し芽胞浮遊液とした。安定な芽胞であることは

- ① アルカリメチレン青染色し、鏡検による90%以上の芽胞形成確認
- ② 4℃保存3日間での生菌数(colony forming unit:CFU)低下が認められない
- ③ 50%エタノール洗浄による生菌数(colony forming unit:CFU)低下が認められない

をチェックしたものを実験に供している。  
※なお培養法についての詳細な記述は情報として不適当と判断し、割愛させていただいた。

##### (2)各種消毒剤の有効濃度測定

###### ①過酢酸液の有効濃度測定

過酢酸原液には酸化成分として有効濃度表示がないため、この原液を適宜精製水で希釈し、RQ flex plus 及びリフレクトクアント過酢酸測定試験紙を用いて測定し、

原液の有効濃度を29%とした。これを実験毎に滅菌精製水にて使用濃度に希釈して用いた。

###### ②次亜塩素酸ナトリウムの有効濃度測定

原液の有効塩素濃度は約4%となっており、これを実験毎に滅菌精製水にて使用濃度に希釈した。またこの一部を採取・希釈して残留塩素測定器及び全塩素濃度測定試薬を用いて濃度測定を行った。

###### ③安定化二酸化塩素の有効濃度測定

非常に安定であることから、製造元における測定値(51300ppm)を原液の有効濃度とし、これを実験毎に滅菌精製水にて使用濃度に希釈して用いた。

##### (3)安定化二酸化塩素の活性化

製造元より提示された有効濃度測定法から、硫酸酸性にすることで遊離型の有効塩素が生成されることより、実験毎に希釈調製した安定化二酸化塩素に1/1000容量の割合で硫酸(1+2)を加え、室温で20分以上活性化を行う。活性化した二酸化塩素を数 $\mu$ l採取してヨウ化カリウムでんぷん紙に滴下し、青紫色への明瞭な変色又は変色後の速やかな脱色により、活性化を確認して試験に用いた。

##### (4)各種消毒剤の使用濃度の決定

予備実験により、室温20分間で容易に $10^6$ CFUの芽胞を不活性化できる濃度を確認し、その濃度を基点としてさらに2段階各々を適宜希釈した。過酢酸は0.025、0.05、0.1%、次亜塩素酸ナトリウムは250、500、1000ppm( $\pm$ 10%)、二酸化塩素は100、200、500ppmで各々実験に使用した。

##### (5)反応中和液の調整

1Mチオ硫酸ナトリウム溶液を孔径0.22 $\mu$ mのカートリッジフィルターで濾過滅菌したものをストックとして、用時に2倍濃度Buffered Peptone Water(以下BPW)に1/10ないし1/40容量添加したもの(終濃度40ないし100mM)を用意し、これを反応中和液として使用した。なお過酢酸溶液の中和には100mMのものを、次亜塩素酸ナトリウムおよび活性

化二酸化塩素の中和には 40mM のものをそれぞれ使用した。

\*1 倍濃度 Buffered Peptone Water(BPW)組成： ポリペプトン：0.1%、NaCl：0.43%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ：26.1mM、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ：50.9mM

#### (6)不活性化効果試験

各消毒剤 0.45ml に炭疽菌芽胞浮遊液を 0.05ml 加え、ピペッティングにてよく攪拌する(9:1 で反応、以下これを反応液とする)。室温で反応を開始し、0 (添加・攪拌直後)、5、10、20 分後に反応液 0.1ml を採取し、反応中和液 0.1ml と混合し反応を停止させた(反応停止液)。この反応停止液を 1 倍濃度 BPW で 10 倍段階希釈する。

角形シャーレに作成した TSA の表面を無菌的によく乾かし、ここに各希釈段階の反応停止液を 25 $\mu$ l、duplicate で滴下する。これを 37℃で 15~18 時間培養し、出現したコロニー(20~100 個/spot)をカウントして、反応液 0.1ml あたりの生菌数を算出した。なおこの方法による最少検出感度は 4CFU/0.1ml である。右にこのプロトコールを示す。

(不活性化反応プロトコール)

消毒剤 0.45ml

芽胞浮遊液 0.05ml

↓  
混合、室温(22~24℃)

0、5、10、20 分 0.1ml 採取  
反応中和液 0.1ml

↓  
混合・反応停止  
BPW にて 10 倍段階希釈

↓  
各希釈段階液 25 $\mu$ l(duplicate)  
TSA(角型シャーレ)に滴下  
(原液~ $10^{-5}$ まで)

## 【結果】

### (1)各消毒剤の中和について

使用した3種類の消毒剤の使用濃度では、反応中和液によりpH及び酸化成分とも完全に中和されており、培養系における菌の発育に対する阻害作用も認められなかった。

### (2)各種消毒剤の不活性化効果

#### ①過酢酸による不活性化効果

I 苗株においては初発生菌数  $2.8 \sim 3.6 \times 10^6$ CFU/0.1ml より、0.1%で5分、0.05%で10分作用させることにより検出限界(4CFU/0.1ml)以下まで不活性化された。また0.025%でも20分の作用で同様に検出限界以下となった(添付資料グラフ1参照)。

34F2 株においては初発生菌数  $1.3 \sim 1.9 \times 10^7$ CFU/0.1ml より、0.1%で5分、0.05%で10分、0.025%で20分の作用でそれぞれ検出限界以下となった(添付資料グラフ2参照)。

#### ②次亜塩素酸ナトリウムによる不活性化効果

I 苗株においては初発生菌数  $2.4 \sim 3.6 \times 10^6$ CFU/0.1ml より、1000ppmで20分作用させることにより検出限界以下となった。しかし550~560ppm及び230~235ppmで $10^5$ CFUオーダー/0.1mlまでの減少にとどまった(添付資料グラフ3参照)。

34F2 株においては初発生菌数  $1.9 \sim 3.2 \times 10^6$ CFU/0.1ml より、1000ppm及び550~560ppmで20分作用させることにより検出限界以下となった。また235~250ppmでは20分作用後で生菌数が $10^2 \sim 10^4$ CFU オーダー/0.1ml とばらつく傾向が認められた(添付資料グラフ4

参照)。

#### ③二酸化塩素(活性化)による不活性化効果

I 苗株においては初発生菌数  $2.3 \sim 8.2 \times 10^6$ CFU/0.1ml より、500ppmで10分作用させることにより検出限界以下となった。200ppmでは $10^4$ CFU/0.1ml 前後までの減少にとどまり、100ppmでは顕著な生菌数減少は認められなかった(添付資料グラフ5参照)。

34F2 株においては初発生菌数  $2.3 \sim 2.8 \times 10^6$ CFU/0.1ml より、500ppmで10分作用させることにより検出限界以下となった。200ppmでは $10^3$ CFU オーダー/0.1ml までの減少にとどまり、100ppmでは $10^5$ CFU オーダー/0.1ml までと顕著な減少は認められなかった(添付資料グラフ6参照)。

## 【考察】

### (1)試験用の芽胞調製について

炭疽菌芽胞はその他のBacillus属菌と比較した場合、その抵抗性は若干ながら低い傾向がある。また芽胞調製についてもBeebyらの用いた枯草菌(*B.subtilis*)芽胞調製法では純度、回収率ともに非常に不良であること経験した。また純度の低い芽胞浮遊液ではデブリスが多くウェポンとして使用される炭疽芽胞を想定した場合、その不活性化効果についても再現が困難になる。今回調製法に関しての明記は避けたが、こうした評価をしてゆく上で調製した芽胞についての品質チェック法等は予め準備しておくべきであろう。

(2)各消毒剤による不活性化効果について

#### ① 過酢酸による不活性化

過酢酸は近年浸漬用消毒剤として国内でも製品化されており、WHO からもその有効性が示唆されている。しかし化学薬品として取り扱われているものは少なく、本薬剤の原液は自己反応性・腐食性を示し、危険物第4類第2石油類に指定されている。また臭気も酢酸同様強い刺激臭を放つ。今回使用した濃度では0.1%では刺激臭もまだ残るが、0.05%以下ではあまり感じなくなる。そして炭疽芽胞に対する不活性化効果は0.05%でも10分間の作用で $10^6$ CFUを不活性化することが供試菌2株で認められた。よって実際に一般環境における消毒に用いる場合は0.05~0.1%で効果が得られると考える。ただし今回環境中より分離した枯草菌及びセレウス菌(*B.cereus*)より調製した芽胞を用いて過酢酸0.07%による不活性化効果を見たところ、セレウス菌で抵抗性が認められた(添付資料グラフ7参照)。こうした耐性芽胞がハイブリットされたウェポンを想定すると、0.1%以上の使用も考慮すべきであろう。

#### ② 次亜塩素酸ナトリウムによる不活性化

今回の不活性化効果試験において供試菌株間で感受性に差がみられた。I 苗株についての有効濃度は1000ppm以上(市販の塩素系漂白剤40~50倍)と、かなりの高濃度での使用が必要となる。34F2株については550ppm以上でも有効性が認められ、235~250ppmでは作用20分の時点で芽胞のブレイクポイントがあると考えられるため、より長時間での作用

が必要となる。しかし本薬剤は一般的に最も入手が安易なため、緊急時における対応には十分と考える。

以前にI 苗株の芽胞1容量に対して塩素液100容量を加えた検討では50ppmでも10分で $10^6$ CFUの不活性が可能であったが、今回はその1/10容量の次亜塩素酸ナトリウムを加えているため、芽胞のブレイクにはより多くの塩素が必要になったと考える。

#### ③ 二酸化塩素(活性化)による不活性化

本薬剤は国内ではプールの殺菌や養殖場の防藻目的等で用いられる場合が多く、殺菌目的よりは抗菌目的で安定化二酸化塩素が使用されている。本薬剤はそのまま使用した場合、芽胞の不活性化には何ら貢献しなかった(データは示さず)。しかし微量の硫酸を加え活性化した場合、500ppm、10分の作用で良好な不活性化効果が認められた。また200ppmにおいてもグラフから30分以上の作用で500ppmと同様の不活性化効果が得られるものと推察される。そして過酢酸と同じく環境分離枯草菌及びセレウス菌芽胞による不活性化効果をみたところ、500ppmにおいてセレウス菌で10分、枯草菌で30分の作用で約 $10^7$ CFUの芽胞を不活性化した(添付資料グラフ8及び9参照)。不活性化効果として株間における差異が非常に少なく、残留性も低いため、広範囲の確実な消毒には最も有効と考える。ただし活性化後2時間以降では二酸化塩素が気化してくるため、活性化後の溶液保存・取り扱いには十分注意が必要である。

### (3)その他の消毒剤について

芽胞に有効とされる消毒剤はアルデヒド類などのアルキル化剤、ヨウ素剤、過酸化水素などがあげられるが、環境からの除染を想定した場合、アルキル化剤は残留性・毒性がともに強いこと、ヨウ素剤は塩素系薬剤に比べ作用に時間を要し、また樹脂類への付着などがあることにより検討からは除外した。また過酸化水素は3%濃度で予備実験を実施したが、良好な不活性化効果が得られず、中和にカタラーゼを使用すると激しく発泡し、未使用では培養において増殖阻害が生じることから検討より除外した。

一般環境での薬剤消毒を考える場合、効果と同様にその薬剤の除去・中和が容易なことも必須条件となる。その上において今回使用した3種類の消毒剤はどれもその条件を満たしていると考えられる。

#### 【結論】

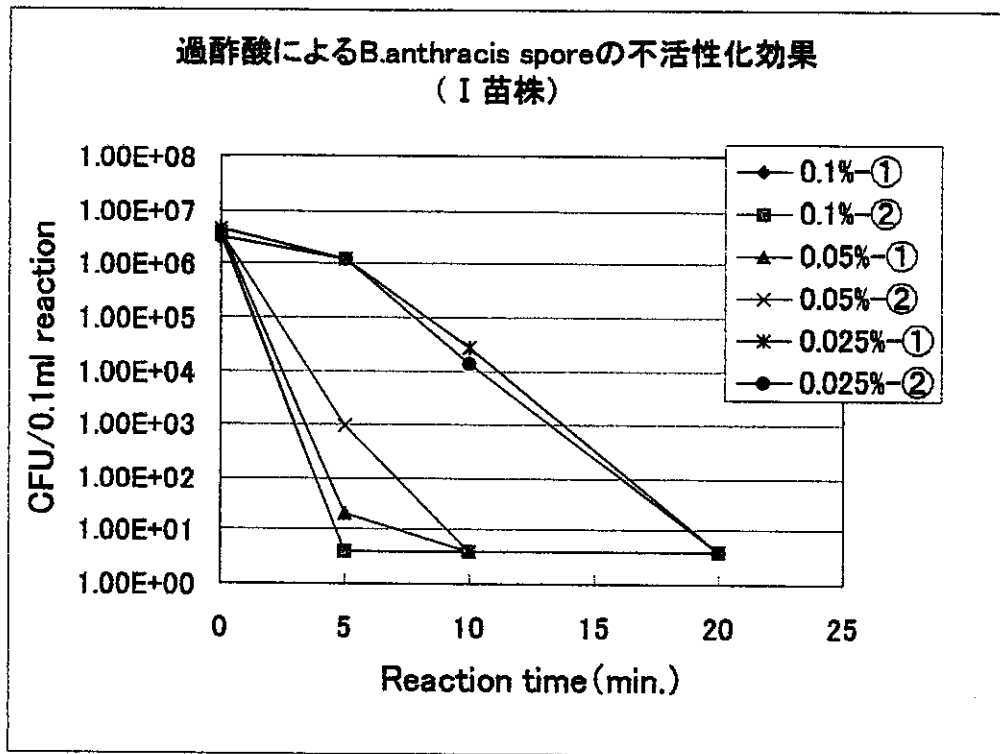
今回使用した3種類の消毒剤いずれについても、炭疽菌2株より調製した芽胞に対して、有効な不活性化効果が認められた。それぞれについては、広範囲かつ病原菌株が判明していない場合には二酸化塩素を、限定された場所で炭疽菌芽胞であることが判明している場合には過酢酸を使用することが有用であると考えられる。ただし両薬剤の使用・管理には十分注意する。また一般生活環境における緊急時対応には高濃度(少なくとも0.1%以上)の次亜塩素酸ナトリウムを使用することが望ましい。この際できる限り長時間(2時間以上)作用させることを原則とする。

#### 参考文献

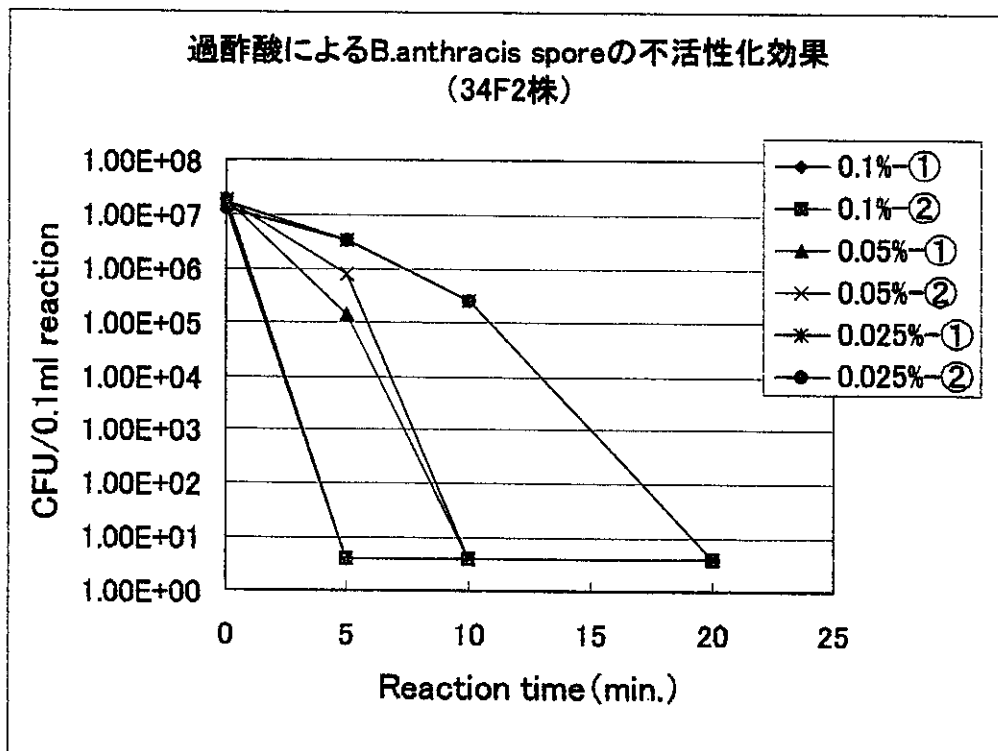
- 1) 防菌防黴ハンドブック 日本防菌防黴学会編 技報堂出版
- 2) WHO/EMC/ZDI/98.6 Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. WHO home page ([http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whoemczdi986\\_nofigs.html](http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whoemczdi986_nofigs.html))
- 3) Beeby MM, Whitehouse CE : A bacterial spore test piece for the control of ethylene oxide sterilization. J Appl Bact 1965 ; 28 : 349-60
- 4) 斎藤章暢 他 炭疽菌芽胞に対する各種殺菌剤の有効性 感染症学雑誌 第76巻4号 2002年
- 5) シグマアルドリッチジャパン 化学物質安全データシート

添付資料

グラフ 1.



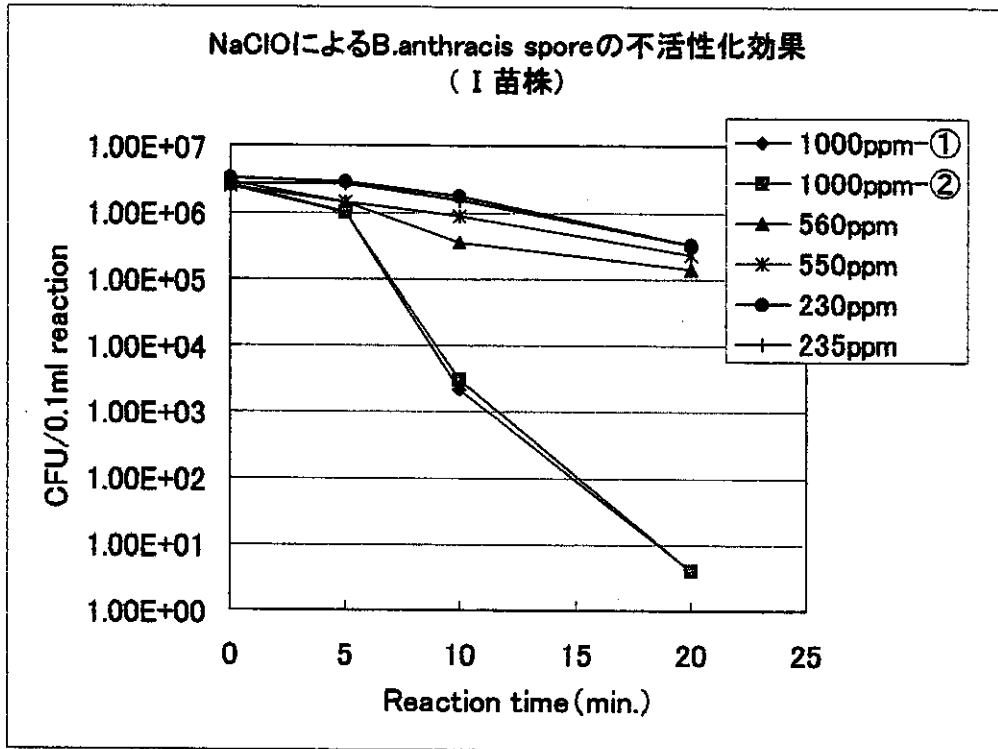
グラフ 2.



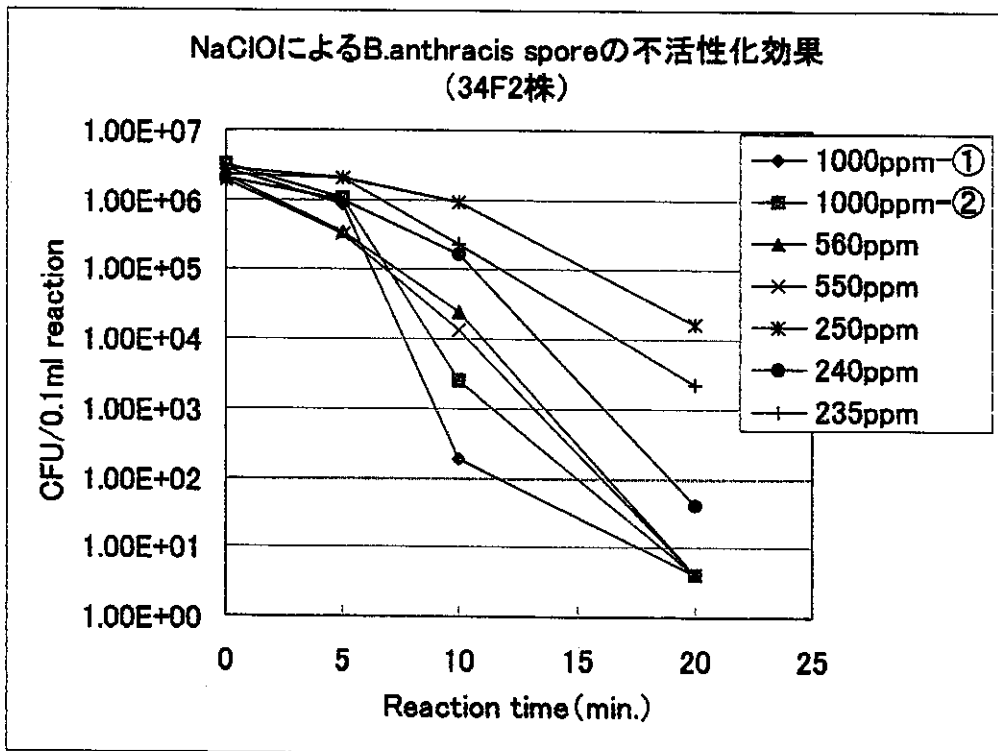


添付資料

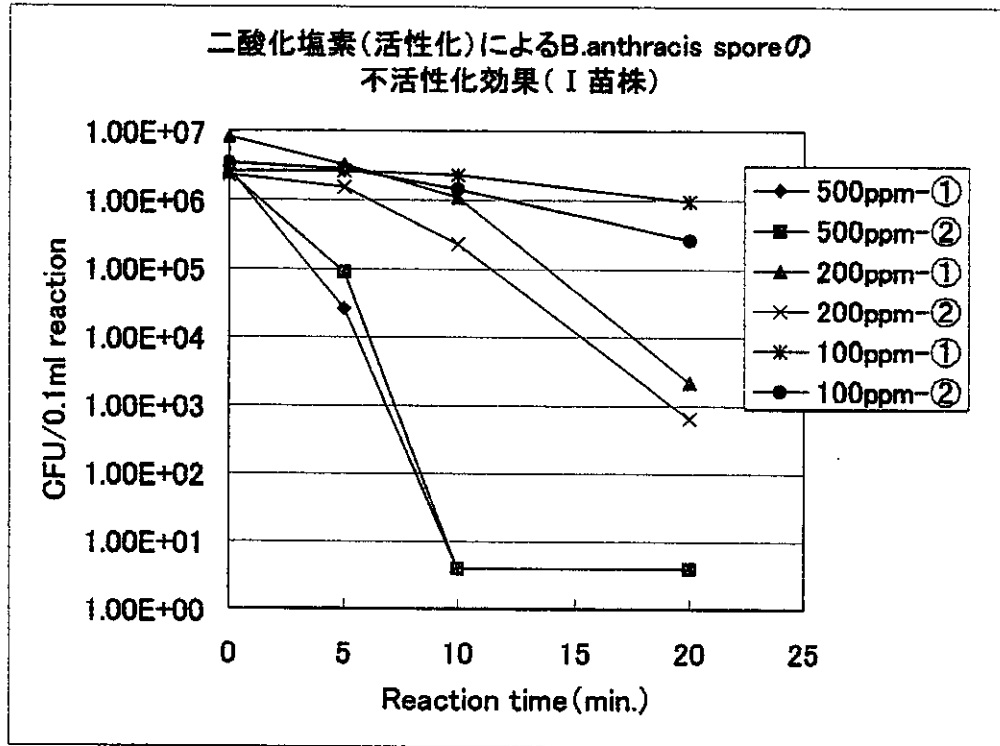
グラフ 3.



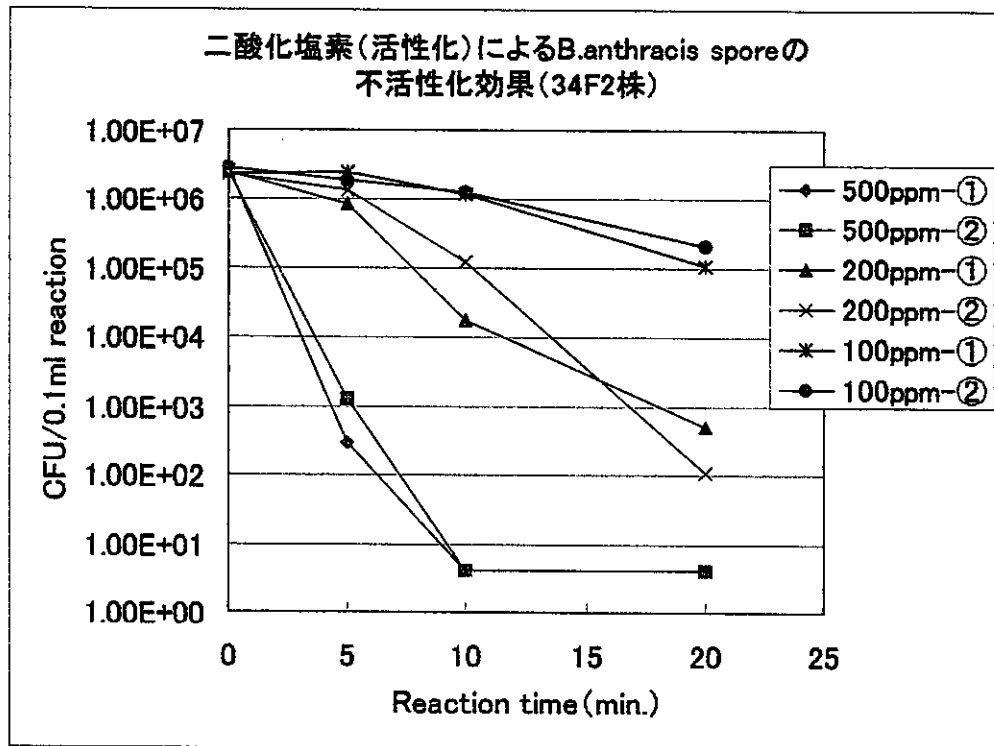
グラフ 4.



グラフ 5.

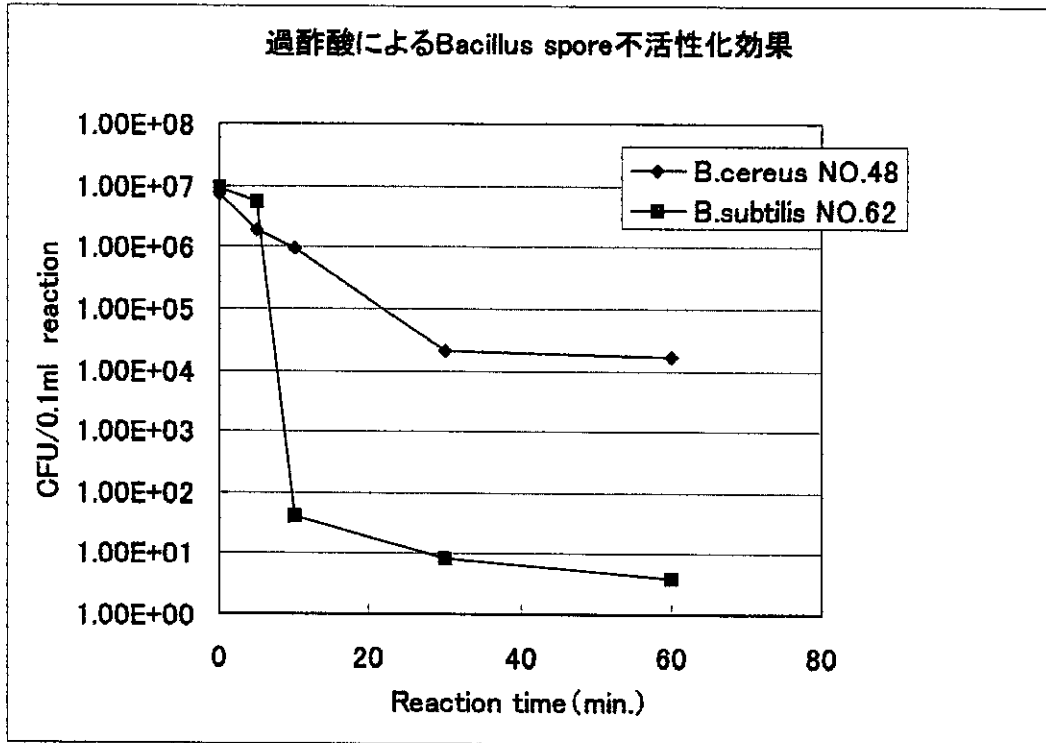


グラフ 6.



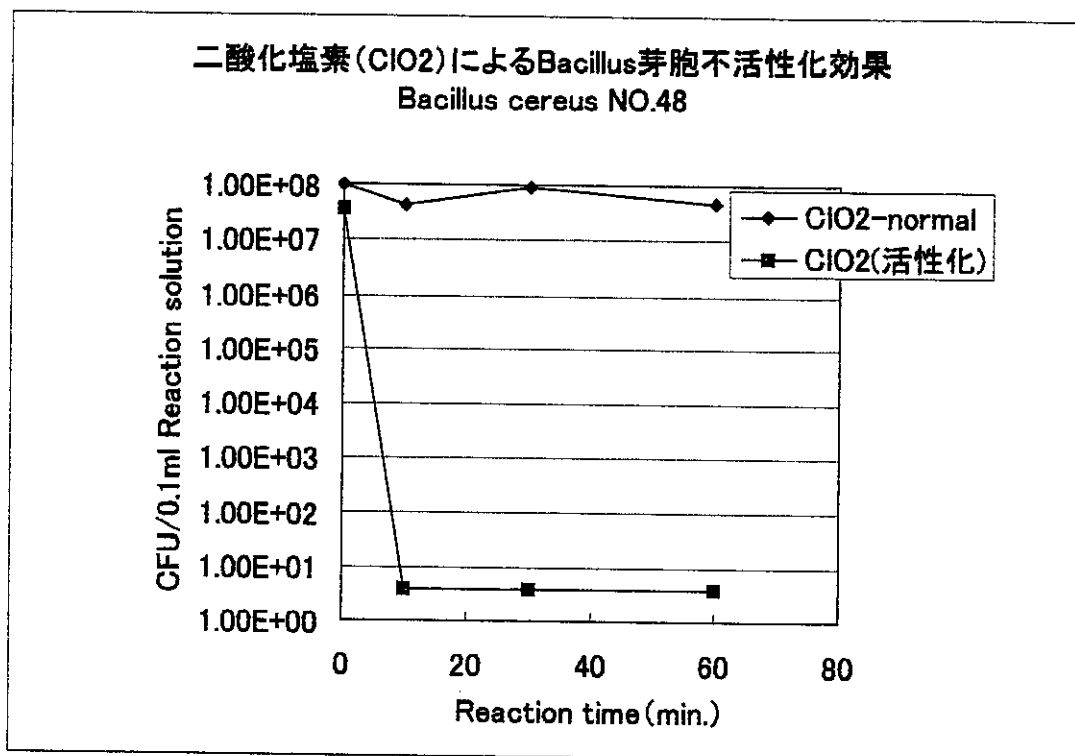
添付資料

グラフ7.



添付資料

グラフ 8.



グラフ 9.

