

## II. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

抗狂犬病ウイルス IgY 抗体によるホルマリン固定材料からの抗原検出法

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長  
研究協力者：朴 天鎬 北里大学獣医畜産学部獣医病理学教室  
研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究要旨：狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。そこで、生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な狂犬病ウイルスの抗原診断系を（1）大腸菌による組換えタンパクの発現、（2）免疫鶏卵法による IgY 抗体の産生、（3）免疫組織抗体法によるホルマリン固定された狂犬病ウイルス抗原の検出法を組み合わせることで可能とした。

A. 研究目的

狂犬病の報告がない日本では可能なかぎり生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な診断・検査法が望まれる。これまでに、大腸菌による組換えタンパク発現系と免疫鶏卵法を併用した安全で安価な狂犬病ウイルス検出用 IgY 抗体の作成に成功している。そこで、狂犬病のウイルス抗原検出を安全に行なうために狂犬病ウイルス感染マウスのホルマリン固定材料を利用して作出 IgY 抗体の免疫組織抗体法への有効性を検討した。

B. 研究方法

狂犬病ウイルスのリコンビナント核蛋白は CVS-11 株（CDC 分与株）から作製した。PCR 増幅した核蛋白遺伝子は pQE

ベクター（キアゲン）に組み込み 6xHis タグ標識蛋白（His-NP）として発現した。

発現 His-NP は Ni-NTA agarose を用いて native condition 下で精製を行い、産卵鶏の左脚大腿筋に 1mg を免疫して鶏卵中に蓄積した IgY 抗体を 8 カラギーナ法を用いて精製した。

抗原検査系の確立には CVS-11 株感染マウス（BALB/c および C57BL/6J）の神経組織のホルマリン固定後にパラフィン包埋されたマウスの脳材料を使用した。免疫組織法はビオチン化抗体と Streptoavidin-peroxidase を用いるダコ社の LSAB Kit で行った。

・産卵鶏への免疫

精製 His-NP を左脚大腿筋の筋肉内に接種。初回免疫には 0.36mg の His-NP を 1ml の FCA と共に接種を行なった。追加免疫は 0.18mg の His-NP と 0.5ml の FIA を 2 週目と 4 週目に行なった。鶏卵は毎日採卵し、卵黄を凍結保存した。

・IgY 抗体の精製 (λカラギーナン法)

1. 卵黄 100g を 300ml の 0.5%NaCl とともに攪拌
2. λカラギーナン (0.4%) 200ml を加えて、室温で 1 時間静置
3. 遠心分離 (9000 rpm、30 分、4°C)
4. 塩析 (3 回)
  - ・上清の 15% (w/v) 量の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて 30 分間静置
  - ・遠心分離 (9000 rpm、30 分、4°C)
  - ・沈澱に 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を加えて溶解
5. 透析

・免疫染色

1. 脱パラフィン
2. 水洗 (10 分、DW、PBS)
3. 0.1%トリプシン (37°C、30 分)
4. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
5. 内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキング (0.3%過酸化水素加メタノール、室温、30 分)
6. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
7. 10%ウサギ血清 (室温、20 分)

8. Blotting off
9. 一次抗体 (anti N IgY、200 倍希釈、4°C、一晚)
10. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
11. 二次抗体 (HRP anti chicken、200 倍、37°C、30 分)
12. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
13. DAKO LSAB 社製 streptavidin-HRP (2 滴、37°C、20 分)
14. PBS 洗浄 (3 回 : total 10 分)
15. DAB で発色
16. 水洗
17. 核染、色出し 10 分
18. 分色
19. 封入

C.研究結果

鶏卵法により作出した大腸菌発現リコンビナント核蛋白 (His-NP) に特異的な IgY 抗体を利用して、狂犬病ウイルスを感染させたマウスのホルマリン固定脳組織から作成したパラフィンブロックの狂犬病ウイルス抗原の検出を免疫組織抗体法により行なった。

作出した抗 His-NP -IgY 抗体は、マウスの中枢および末梢の神経組織中に感染している CVS-11 株の核蛋白を特異的に検出可能な事が示された (図 1)。

D.考察

大腸菌による組換えタンパク発現系と免疫鶏卵法を併用して作成した狂犬病ウイルス検出用 IgY 抗体は、ホルマリン固定脳組織から作成したパラフィンブロックを利用した免疫組織抗体法において狂犬病ウイルス抗原の検出が可能である事が示された。

#### E. 結論

本研究により、生ウイルスを使用しない安全性の高い簡便な狂犬病ウイルスの抗原診断系を（１）大腸菌による組換えタンパクの発現、（２）免疫鶏卵法による IgY 抗体の産生、（３）免疫組織抗体法によるホルマリン固定された狂犬病ウイルス抗原の検出法を組み合わせる事によって可能とした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Motoi Y., Sato K., Hatta H., Morimoto K., Inoue S. and Yamada A. 2005. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. Vaccine in press.

Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto K. and Yamada A. 2005. Detection of Rabies-Specific Antigens

by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. JJID 58: in press.

##### 2. 学会発表

朴 天鎬、井上 智、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス (CVS-11) を感染させた C57BL/6J マウスの中枢神経系と骨格筋の感染病理。第 137 回日本獣医学会、2004 年、9 月、札幌

#### 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

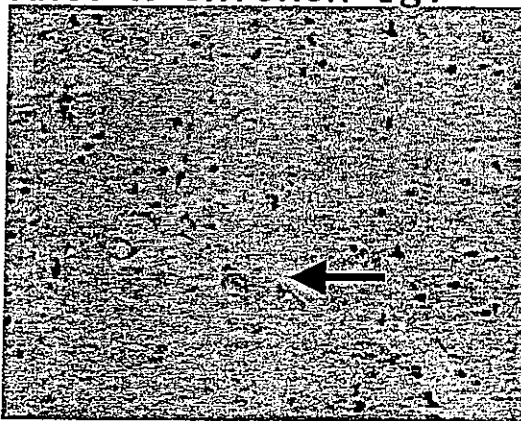
なし

##### 3. その他

なし

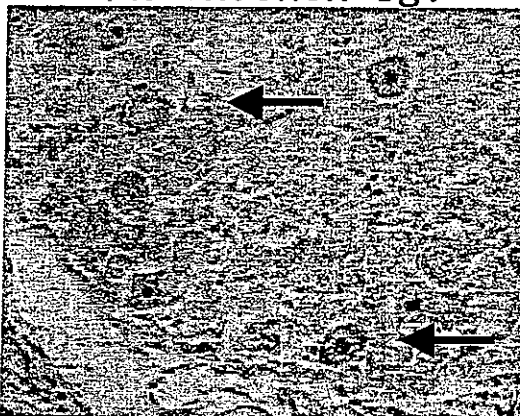
図 1

Anti-N chicken IgY



C57BL/6J、脊髓、x 400

Anti-N chicken IgY



BALB/c、三叉神経節、x 400

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

狂犬病ウイルスの遺伝子診断に使用する安全で簡易な陽性対照鋳型 RNA の作出

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長

研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室  
加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究要旨：日本では40年以上狂犬病の発生はないが、近年の国際的な流通拡大、無検疫動物の大量輸入、港湾の不法上陸犬などによって偶発的な狂犬病の発生が危惧されている。狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査の陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、狂犬病の遺伝子診断用に、生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの作出を行なった。同時に、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合には制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法によって迅速に検証できるようにした。

## A. 研究目的

狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断法の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査に使用する陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、狂犬病の遺伝子診断用に、生ウイルスを使用しない安全で再生産可能な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの作出を行なった。

## B. 研究方法

### 陽性対照鋳型 RNA 合成のための鋳型 DNA の作出

CVS-11 株の N 遺伝子全長を含む cDNA (1,506bp : Primer P1 & 304) を pGEM-T Easy vector にクローニング (pGEM-T E P1/304) した。作出した鋳型 DNA の遺伝子内には Overlap PCR 法を用いて4カ所に4種類の異なる制限酵素サイトを挿入

(pGEM-T E P1/304 mutant) して PCR により増幅される遺伝子を特定可能とした。

### 陽性対照とする鋳型 RNA の合成

陽性対照鋳型 RNA 合成用の鋳型 DNA には pGEM-T E P1/304 mutant を Apa I にて1本鎖化したものを使用した。陽性対照 (-)RNA 鎖は pGEM-T Easy Vector の SP6 RNA polymerase promoter 活性を利用して Riboprobe in vitro transcription (RIT) systems により合成した。陽性対照鋳型 RNA には Dnase によって RNA 合成に使用した鋳型 DNA を処理した後にフェノール・クロロホルム処理によって精製したものをを使用した。

### 作出した陽性対照鋳型 RNA を利用した RT-PCR

正常脳組織を陽性対照鋳型 RNA とともに TRIZOL でホモジナイズした後、試薬のプロトコールに従い RNA の抽出を行った。抽出した RNA は、AMV RTase (Promega) によ

り JW12 プライマー (ATGTAACACC(c/t)CTACAATG) により RT を行った。RT 産物は EX-Taq (TaKaRa) を使用して PCR を 10g プライマー (CTACAATGGATGCCGAC) と 304 (TTgACgAAGATCTTGCTCAT) プライマーで行なった。PCR による特異的遺伝子の増幅は、1% agarose gel(TAE) による電気泳動の後に EtBr 染色を行い UV イルミネータで確認した。

#### 作出した陽性対照鋳型 RNA を用いて行なった RT-PCR 産物の同定

作出した陽性対照鋳型 RNA によって増幅された遺伝子産物の同定は、鋳型 DNA の遺伝子内に挿入した 4 種類の異なる制限酵素サイトの切断パターンと挿入した制限酵素サイトの塩基配列をパイロシーケンシング法により短時間で迅速シーケンスすることにより可能とした。

### C. 研究結果

#### 陽性対照とする鋳型 RNA の合成

作出した pGEM-T E P1/304 vector を 1 本鎖化して得た DNA を鋳型として SP6 RNA polymerase により合成される 1 本鎖 RNA の予想サイズは 1,628b であり、今回 RT systems により合成された鋳型用のマイナス鎖 RNA は、アガロースゲル上で 1,628b 相当の位置に観察された。(図 3)

#### RT-PCR の成績

制限酵素サイトを挿入した合成マイナス鎖 RNA と制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来のマイナス鎖 RNA とともに RT 後に PCR のプライマーを 10g/304 の組合せで行った結果、目的サイズの cDNA が増幅された。また、RNA 合成に使用した鋳型 DNA による遺伝子増幅の否定は RTase を加えない RT-PCR の系も同時行い、増幅産物がないことで確認した。(図 4)

#### 制限酵素処理の成績

制限酵素サイトが挿入された(-)鎖 RNA を RT-PCR で増幅した cDNA は、挿入した全ての制限酵素により予想された 2 つのサイズに切断された。一方、制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来の(-)鎖 RNA を RT-PCR で増幅した cDNA は、今回使用した何れの制限酵素によっても切断されなかった。この結果により陽性対照として使用した RNA には新たに挿入した制限酵素サイトが確実に存在していることが確認できた。(図 5)

#### パイロシーケンスによる塩基配列の確認

作出した鋳型 DNA の混入による擬陽性の確認は、挿入した制限酵素サイトの塩基配列の決定によって行うことが可能であり、今回行った実験では陽性対照として使用した RNA から RT-PCR により増幅した産物の塩基配列を確認したところ間違いなく、陽性対照の塩基配列を確認できた。一方、ウイルス由来の RNA から RT-PCR を行った産物には制限酵素サイトはなく、ウイルス本来のシーケンスが確認できた。(図 6)

### D. 考察

今回、狂犬病の遺伝子診断に必要な陽性対照用の鋳型 RNA を人工的に合成するシステムを確立した。これにより、生ウイルスを使用しないで安全かつ安価に陽性対照用の鋳型 RNA を産生することが可能となり、狂犬病の遺伝子診断において必要とされる陽性対照に狂犬病ウイルスを使用しないで RT-PCR を行なうことが可能になった。また、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合には、挿入した特異な制限酵素サイトの制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法による迅速な塩基配列の特定によって短時間で検証を可能にした。

## E. 結論

狂犬病の発生が疑われた場合の迅速な検査法として遺伝子診断法の普及が期待されるが、狂犬病清浄国である国内で検査に使用する陽性対照をウイルスとして保持することは容易でない。そこで、今回、狂犬病の遺伝子診断に必要となる陽性対照用の鋳型 RNA を人工的に合成するシステムを確立した。また、陽性対照遺伝子のクロスコンタミネーションが疑われた場合に制限酵素処理もしくは Pyrosequencing 法によって迅速に検証することを可能にした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 誌上発表

Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. 2004. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology*. 318:295-305.

Inoue, S., Noguchi, A., Tanabayashi, K. and Yamada, A. 2004. Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnosis of *Bacillus anthracis*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:29-32.

Inoue, S., Asano, M., Motoi, Y., Makino, T. and Yamada, A. 2004. The Absence of Anti-Rabies Antibody in Sera of the Feral Raccoons (*Procyon lotor*) Captured in Hokkaido, Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 57:110-112.

Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A., Kurata, T. 2004. Characterization of Oita virus 296/1972 of *Rhabdoviridae* isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch Virol.* 149:1139-54.

Nakamichi K., Inoue S., Takasaki T., Morimoto K. and Kurane I. 2004. Rabies Virus Stimulates Nitric Oxide Production and CXC Chemokine Ligand 10 Expression in Macrophages through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2. *J. Virol.* 78:9376-88.

井上 智。トピックス：日本の狂犬病予防と危機管理。感染症等情報 (World Focus) :No55、1-2、2004

森本金次郎、井上 智。感染症。42。リッサウイルス感染症。編集：竹田美文、木村 哲。朝倉書店：179-182、2004

井上 智。感染症の診断・治療ガイドライン 2004。リッサウイルス感染症。日本医師会雑誌、臨時増刊号 132：174-175、2004

最新版 家庭医学大全科 総合監修：高久史磨、北村惣一郎、猿田享男、福井次矢。法研：2004

井上 智。狂犬病～日本とアジアをとりまく状況～。特集 日本画直面する狂犬病の脅威。Journal of Modern Veterinary Medicine、82:6-10、2005

#### 学会発表等

Inoue,S.,Noguchi,A., and Akio,Y. Preparation of Safe and Reproducible Positive-control for Moleclar Diagnosis of Rabies. Fortieth anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program (38th Joint Working Conference on Viral Diseases). 7-9 December, 2004. Kyoto, Japan.

井上 智。人と動物に共通の感染症の予防対策と危機管理：危機意識の継続。食染協総会后講演会。日本食品洗浄衛生協会。2004年、5月20日、東京



井上 智。狂犬病の現状と防疫の要点。愛護動物管理関係研修会。栃木県動物愛護指導センター。2004年、6月9日、栃木県

井上 智。人獣共通感染症 (zoonosis) について。家畜衛生講習会 (獣疫学特殊講習会)。独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所。2004年、9月28日、茨城県

井上 智。人獣共通感染症の最近の話題 (人と動物に共通の感染症の予防対策と危機管理－危機意識の継続)。獣医師講習会。広島県獣医師会畜産部会。2004年、10月27日、広島県

井上 智。世界における狂犬病の発生状況について。平成16年度狂犬病予防等技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2004年、11月5日、東京 (東京大学大講堂)

井上 智。動物由来感染症における獣医師の役割。平成16年度 四国地区公衆衛生講習会。社団法人徳島県獣医師会。2004年、11月20日、徳島県

井上 智。日本の狂犬病予防と危機管理。学術フロンティア 第1回公開シンポジウム「人獣共通感染症のサーベイランスと制御」。日本大学生物資源科学部 日本大学大学院獣医学研究科。2004年、11月27日、神奈川県

井上 智。国内外における狂犬病の現状について。群馬県甘楽富岡狂犬病連絡予防協議会研修。国立感染症研究所 (共用第二会議室)。2004年、12月2日、東京

井上 智。人と動物の共通感染症。平成16年度臨床獣医師講習会。日本獣医師会 栃木県獣医師会。2005年、1月14日、栃木県

井上 智、野口 章、加来義浩、反町士朗、根本卓弥、平塚千書、更科 順、高橋まり、

山形 章、松澤留美子、林 裕一、出村尚子、高附敏幸、山田章雄。不法上陸犬が報告された港湾地域の放浪犬における狂犬病防御抗体の保有状況。第137回日本獣医学会、2004年、9月、札幌

朴 天鎬、井上 智、野口 章、小山田敏文、吉川博康、山田章雄。狂犬病ウイルス (CVS-11) を感染させた C57BL/6J マウスの中樞神経系と骨格筋の感染病理。第137回日本獣医学会、2004年、9月、札幌

野口 章、井上 智、棚林 清、山田章雄。狂犬病ウイルスの遺伝子診断に使用する安全で簡易な陽性対照鋳型 RNA 産生システムの確立。第52回日本ウイルス学会、2004年、11月、横浜

## 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

図 1

# 陽性対照鋳型RNAを合成するための鋳型DNAの作出

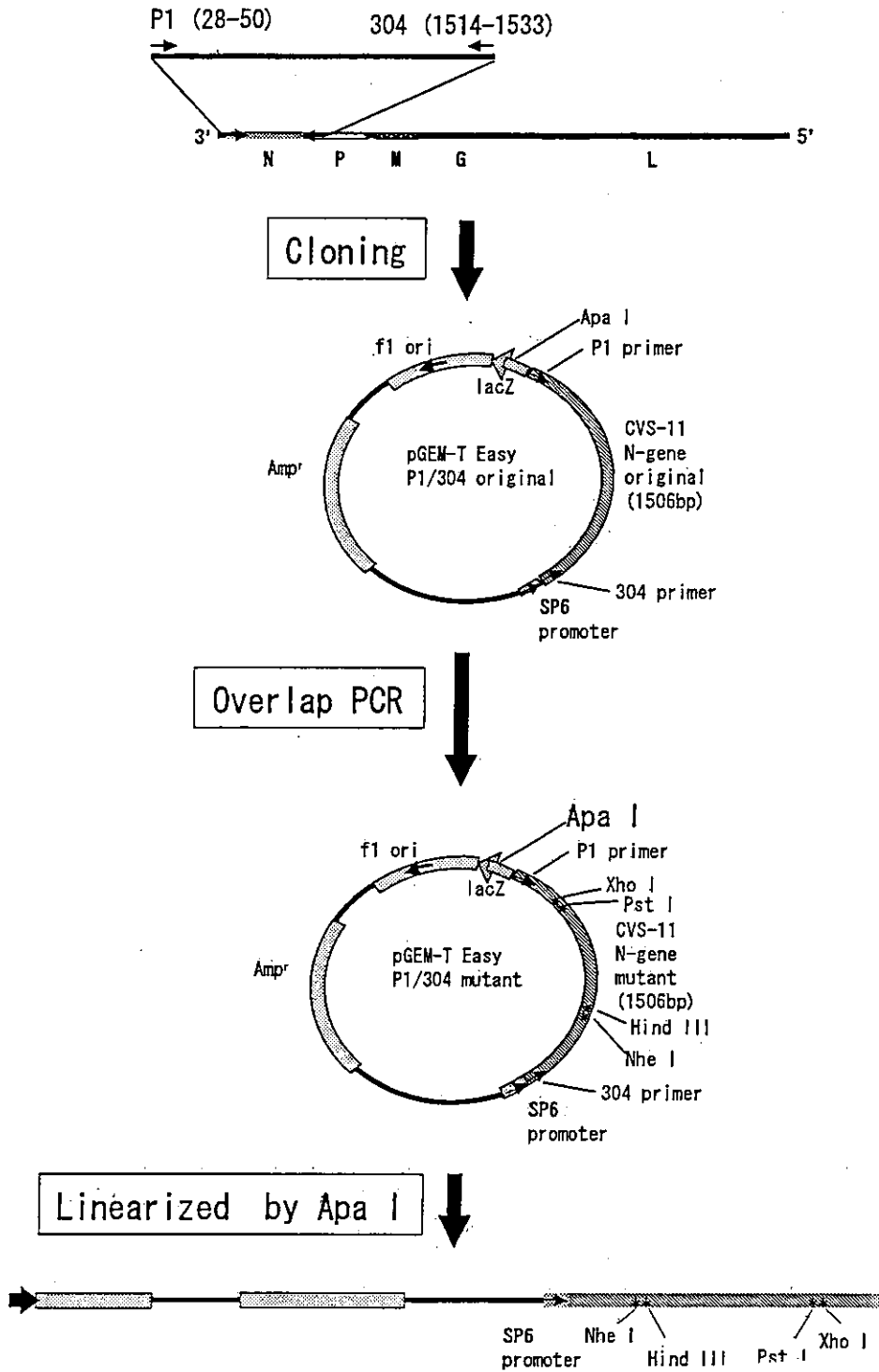


図 2

陽性対照とする鋳型マイナス鎖RNAの合成と  
合成した鋳型RNA鎖を使用した RT-PCR

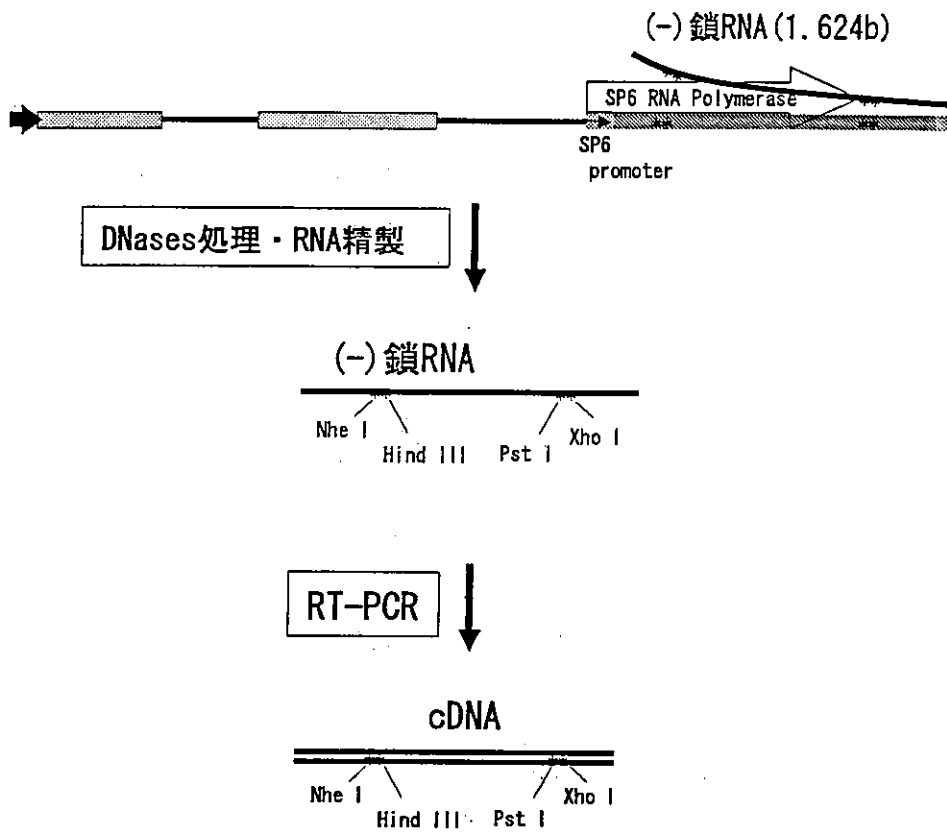
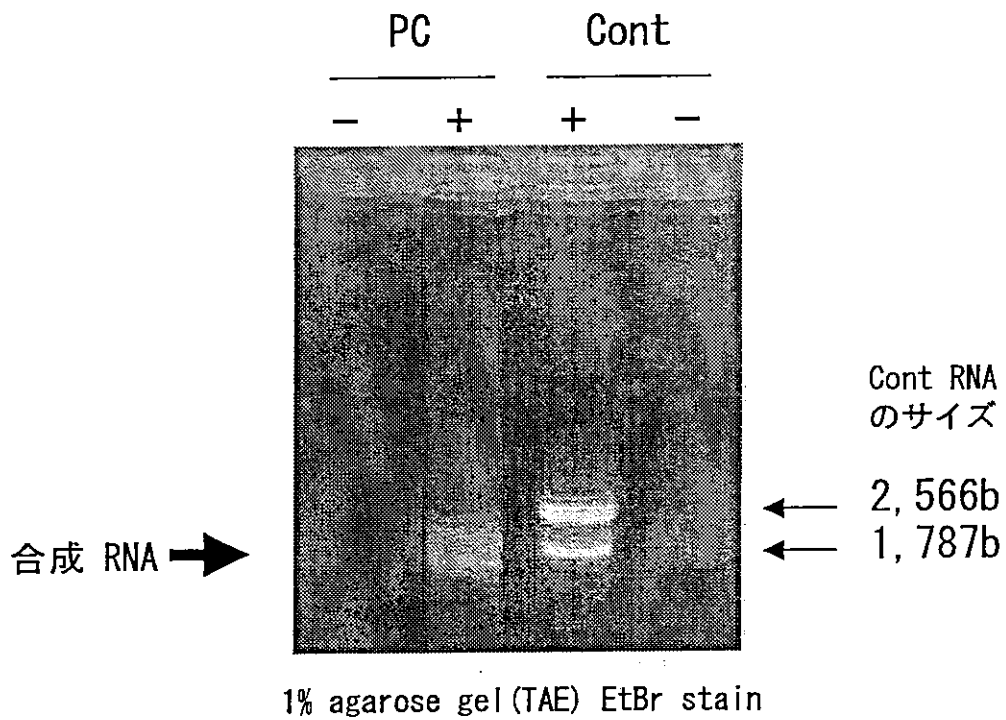


図 3

RNA polymeraseにより合成した1本鎖の  
マイナス鎖 RNA (陽性対照の鋳型RNA)

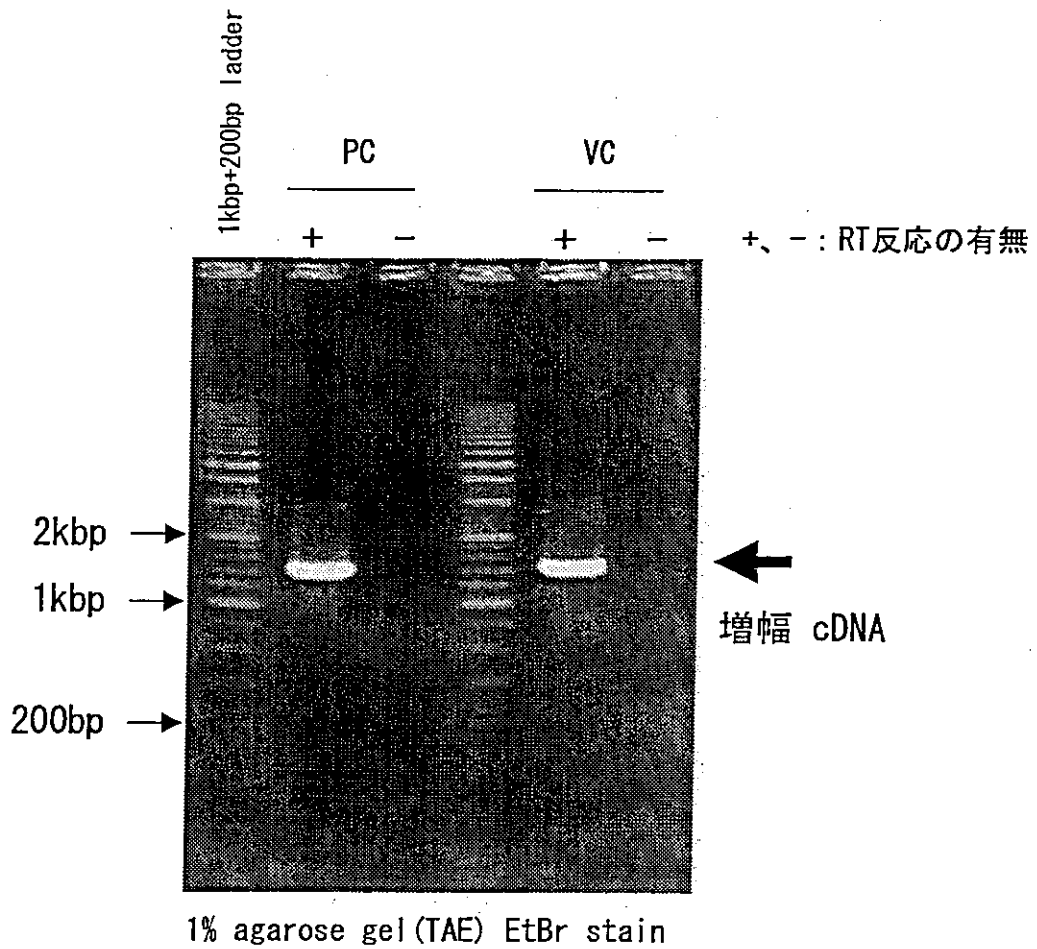


PC: RIT systems により pGEM-T E P1/304 mutant  
Vector から合成した鋳型用のマイナス鎖RNA

Cont: RIT systems 附属の 鋳型 DNA を利用して  
合成した2種類の Control RNA鎖

図 4

合成した鋳型用のマイナス鎖 RNA  
を利用した RT-PCR の成績

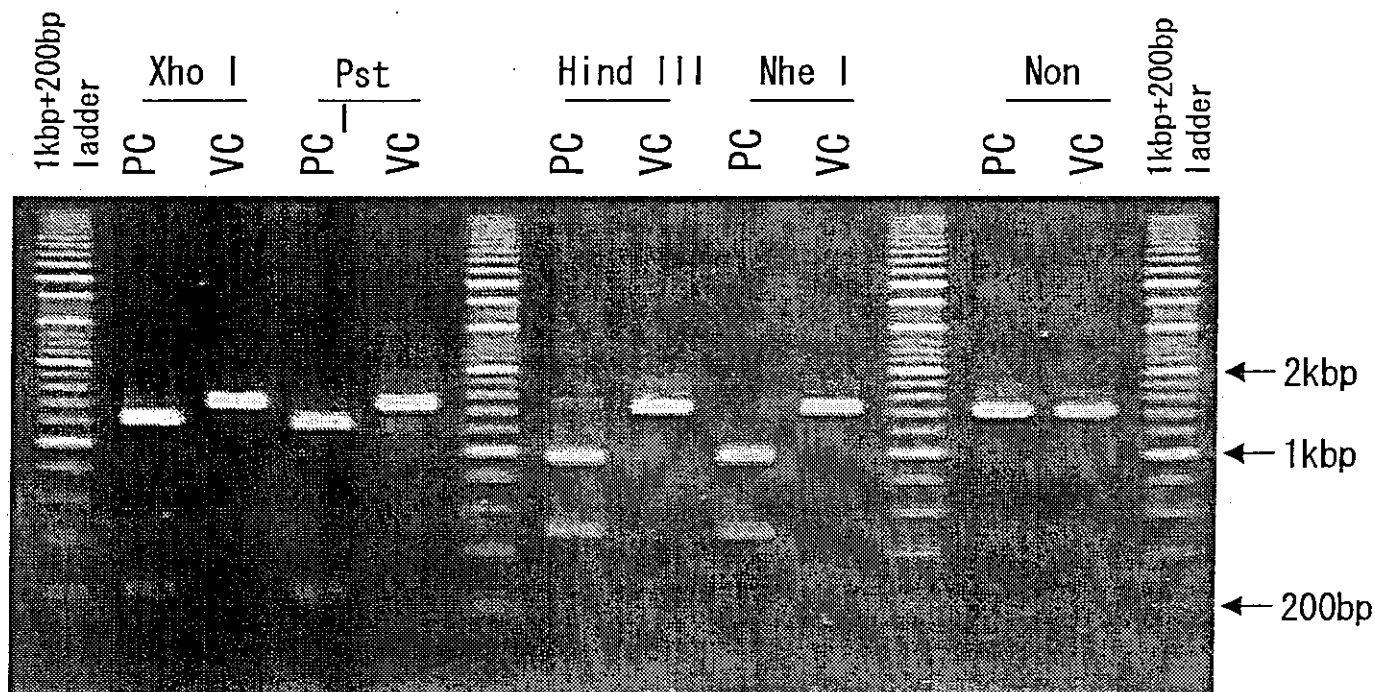


PC: 制限酵素サイトを挿入した pGEM-T E P1/304 Mutant vector から合成したマイナス鎖RNAの RT-PCR

VC: 制限酵素サイトが挿入されていないウイルス由来のマイナス鎖RNAのRT-PCR

図 5

合成した鋳型用のマイナス鎖 RNA を利用した RT-PCR 産物の制限酵素処理



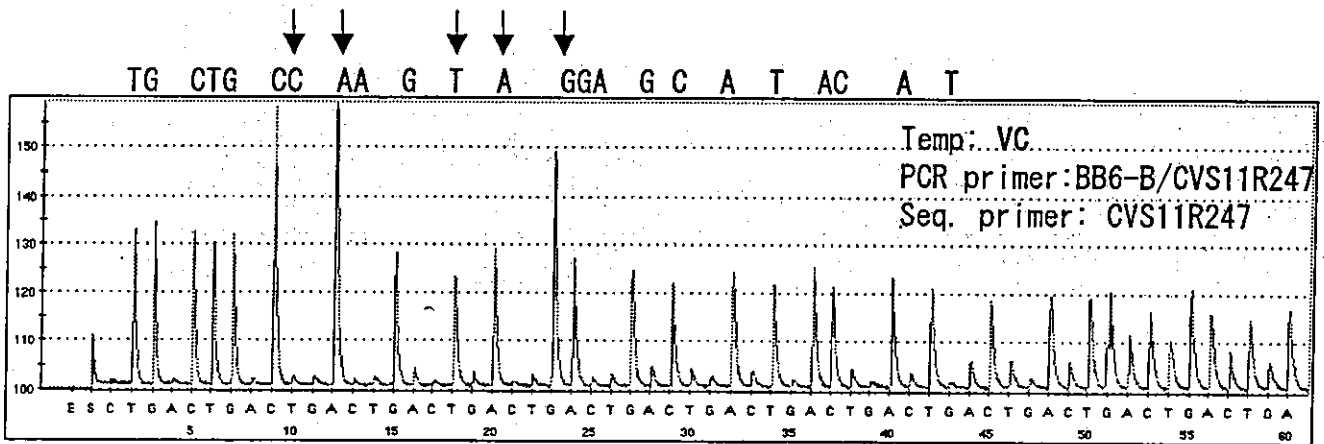
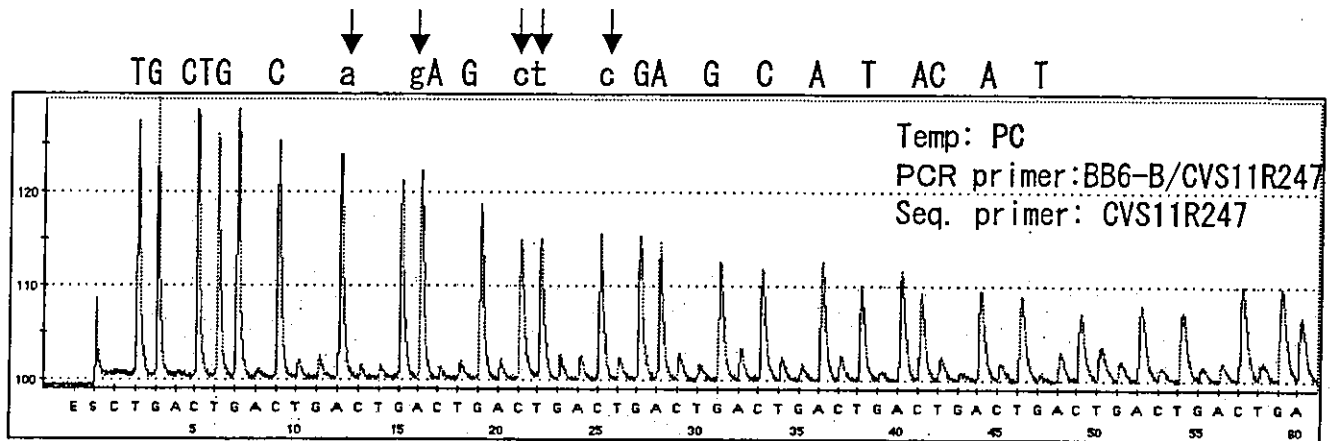
1% agarose gel (TAE) EtBr stain

合成した鋳型用マイナス鎖 RNA の RT-PCR 産物を制限酵素処理した場合の切断断片サイズ

{	Xho I:	218bp + 1,250bp (Total: 1,468bp)
	Pst I:	230bp + 1,238bp (Total: 1,468bp)
	Hind III:	463bp + 1,005bp (Total: 1,468bp)
	Pst I:	458bp + 1,011bp (Total: 1,468bp)

図 6

Pyrosequencing法を用いた鋳型 DNA 混入による擬陽性の迅速な確認



Pst I    Xho I  
 CVS11 PC. . . . . ag . . . . .  
 CVS11 VC. TGCTGCCAAGTAGGAGCATACAT

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

炭疽菌の遺伝子診断を簡便かつ容易にする陽性対照鋳型 DNA の作出

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部第二室長

研究協力者：奥谷 晶子 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究協力者：野口 章 国立感染症研究所獣医科学部第二室

研究要旨：国内の公衆衛生領域での炭疽菌診断は偶発的な事例に対する迅速な緊急対応が重要課題であるが、遺伝子診断では擬陽性や陰性時の PCR 反応系の検証が可能であり非特異な遺伝子産物の特定が容易かつ簡便であることが求められる。そこで、（１）炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物とサイズが異なるが同じプライマーで増幅できる陽性対照鋳型 DNA を作出して PCR 反応系の検証を可能とした。（２）炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物に対するサイズ・マーカ―を大腸菌の 16S rRNA 遺伝子由来の PCR 産物から作成して PCR サンプル調整時の検体間のクロス・コンタミネーションを危惧することなく簡便かつ容易に擬陽性および陰性時の PCR 反応系の検証を可能とした。本研究により、炭疽菌の遺伝子診断において生菌を使用しない安全で簡便かつ PCR 反応系の検証が可能となった。

A. 研究目的

生物テロへの迅速な対応を可能とするために炭疽菌の遺伝子診断が一般的に行なわれている。国内の公衆衛生領域での炭疽菌診断は偶発的な事例に対する迅速な緊急対応が重要課題である。このような事例における遺伝子診断では擬陽性や陰性時の PCR 反応系の検証と非特異な遺伝子産物の判定が容易な簡便な診断系を確立しておく必要がある。今回、生菌を使用しない安全で簡便な診断用の陽性対照鋳型 DNA に加えて PCR 反応系の検証を可能とする陽性対照鋳型 DNA を作成した。

B. 研究方法

炭疽菌の毒素遺伝子である *pag* および荚膜遺伝子 *cap* を WHO 推奨プライマー (*pag* 遺伝子は PA5 および PA8、*cap* 遺伝子は CAP1234 および CAP1301 を使用した) により PCR 増

幅した。増幅した PCR 産物 *pag* 遺伝子 (603bp) および *cap* 遺伝子 (846bp) を pGEM-T プラスミド・ベクターに組み込み、全長鋳型 DNA (PA-pGEM および CAP-pGEM とする) を作成した (図 1)。これらの全長鋳型 DNA は陽性検体由来の PCR 産物とサイズが全く同じとなる。そのため検体間クロス・コンタミネーションによる擬陽性の判定が必要となり、迅速性を損なう可能性が考えられる。そこで、PCR の対照 DNA として用いるため、挿入した PCR 産物のサイズを短くして対照と検体由来のバンドを判別できるようにした。つまり、PA-pGEM の *pag* 遺伝子内で 2 カ所切断する制限酵素 *NspV* で切断した後、self ligation により PAshort-pGEM (332bp) を、また、CAP-pGEM の *cap* 遺伝子内で合成プライマーによる overlap-PCR を行い CAPshort-pGEM (490bp) を作出した (図 1)。



また、陽性バンドのサイズ・マーカーとして使用するために、WHO 推奨の炭疽菌検出用プライマーにより増幅されるサイズである *pag* 遺伝子 (603bp) および *cap* 遺伝子(846bp) と同じサイズが増幅されるようデザインしたプライマーを用いて大腸菌 16S rRNA 遺伝子を鋳型とした PCR 反応を行った。

### C. 研究結果

WHO 推奨の炭疽菌検出用プライマーによって PAshort-pGEM は 331bp、CAPshort-pGEM は 490bp のフラグメントが増幅された。これにより、菌株由来の PCR 産物との区別が可能となり、PCR 反応系の検証が可能となった (図 2、3)。

また、*pag* 遺伝子の PCR 産物 (603bp) および *cap* 遺伝子 PCR 産物 (846bp) と同じサイズになるようにデザインしたプライマーで大腸菌 16S rRNA 遺伝子を鋳型とした PCR を行い、増幅された PCR 産物が炭疽菌遺伝子配列と異なる配列をもつが陽性検体と同じサイズを示すサイズ・マーカーとして使用できることを確認した (図 2、3)。

### D. 考察

今回作出した対照鋳型 DNA は、炭疽菌の染色体遺伝子を鋳型とした PCR 産物と増幅サイズが異なるために、炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物との区別が容易である。そのため陰性時の PCR 反応系が正常に機能しているかを確認するための対照 DNA として、検体間のクロス・コンタミネーションを考慮せずに使用することが可能である。炭疽菌遺伝子由来の PCR

産物のサイズ・マーカーとしては、大腸菌の 16S rRNA 遺伝子から増幅した PCR 産物を用いることで、より精確な遺伝子診断系を確立することができた。

### E. 結論

炭疽菌の遺伝子診断の際に、生菌を用いない安全な陽性対照がバイオ・セーフティ上必要である。炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物をそのまま組み込んだ鋳型 DNA を用いた場合、増幅される PCR 産物は陽性検体と同じサイズであるため、検体へのクロス・コンタミネーションが生じた場合、擬陽性かどうかの判定に時間がかかるという課題がある。そこで今回、炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物とはサイズが異なるが、同じプライマーで増幅できる陽性対照鋳型 DNA を作出した。作出した DNA は、PCR 反応系の検証が可能となる対照 DNA として利用できることを確認した。さらに、炭疽菌遺伝子由来の PCR 産物に対するサイズ・マーカーとしてこれらのサイズと同じとなるようにデザインされた大腸菌の 16S rRNA 遺伝子由来の PCR 産物を用いることにより、PCR サンプル調整時の検体間のクロス・コンタミネーションを危惧することなく簡便かつ容易に擬陽性および陰性時の PCR 反応系の検証を行うことが可能となった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Inoue, S., Noguchi, A., Tanabayashi, K. and Yamada, A. 2004. Preparation of a Positive Control DNA for

Molecular Diagnosis of Bacillus  
anthracis. Jpn. J. Infect. Dis.  
57:29-32.

## 2.学会発表

奥谷晶子、井上 智、野口 章、棚林 清、  
山田章雄。炭疽菌の遺伝子診断を簡便かつ容  
易にする陽性対照鑄型 DNA の作出。第 138  
回日本獣医学会、2004 年 9 月、北海道

## 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

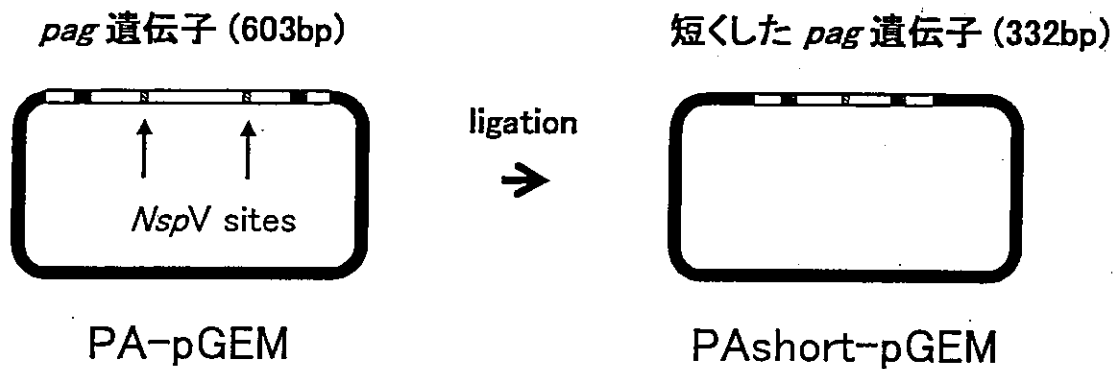
なし

### 3.その他

なし

図1:今回作出したサイズの短い陽性対照鋳型DNA

*pag* 遺伝子  
遺伝子内を2カ所切断する制限酵素の利用



*cap* 遺伝子  
遺伝子内overlap-PCRの利用

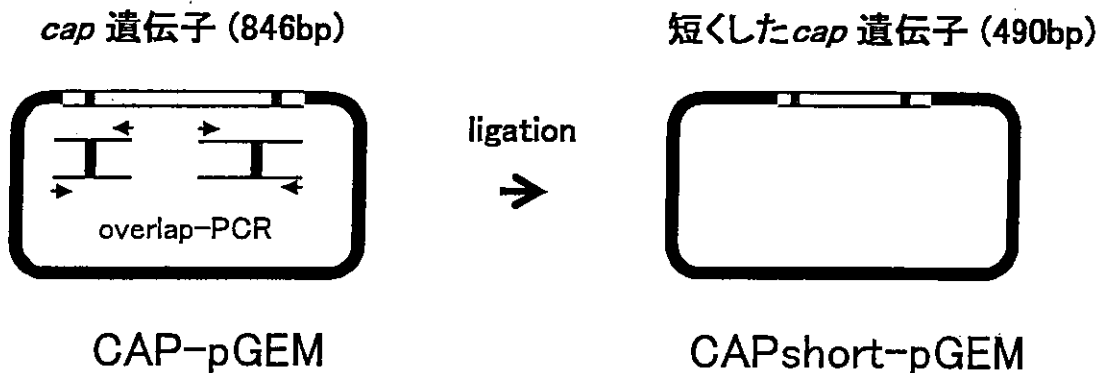
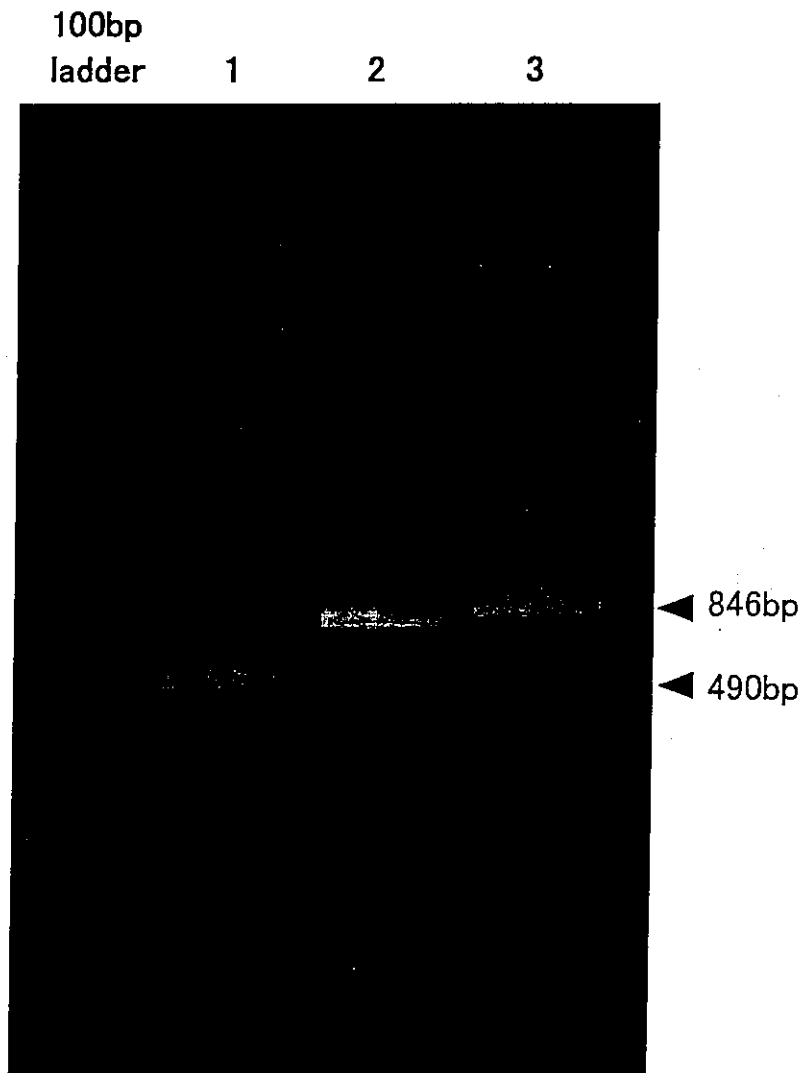


図2: 作出した陽性対照DNAのPCR産物泳動像  
— *cap* 遺伝子 —



Lane 1: CAPshort-pGEM  
2: CAP-pGEM  
3: *E. coli* 16S rRNA 846bp